



**Separate Betrachtung der beiden miR-122-Bindungsstellen
in der Hepatitis C Virus 5'-UTR
im Hinblick auf die
Translationsstimulation und RNA-Stabilität**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
im Fachbereich Biologie und Chemie
an der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Anika Nieder-Röhrmann
M.Sc. Biologin

Gießen, August 2016

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2013 bis Juni 2016 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Niepmann im Biochemischen Institut des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen angefertigt. Die Promotion wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Einzelprojekts Ni 604/2-2 und der International Research Training Group GRK 1384 „*Enzymes and Multienzyme Complexes acting on Nucleic Acids*“ gefördert.

Erstgutachter:

Prof. Dr. Albrecht Bindereif

Institut für Biochemie

Fachbereich für Biologie und Chemie

Justus-Liebig-Universität Gießen

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Michael Niepmann

Biochemisches Institut

Fachbereich Humanmedizin

Justus-Liebig-Universität Gießen

Zusammenfassung

Das Hepatitis C Virus (HCV) gehört zur Familie der *Flaviviridae* und besitzt ein einzelsträngiges RNA-Genom mit positiver Polarität. Das Genom setzt sich aus einem offenen Leserahmen (ORF), kodierend für ein Polyprotein, sowie zwei strukturreichen untranslatierten Regionen (UTRs) zusammen. Die 5'- und 3'-UTR flankieren den ORF und sind an der Regulation der viralen Translation und Replikation entscheidend beteiligt. Die *internal ribosome entry site* (IRES) in der HCV-5'-UTR ist dabei unerlässlich für die Translationsinitiation. Darüber hinaus befinden sich zwei konservierte microRNA-122- (miR-122-) Bindungsstellen am Anfang der 5'-UTR. Es wurde bereits nachgewiesen, dass diese Bindung die HCV-RNA-Replikation und -Translation sowie die Stabilität der viralen RNA erhöht.

Im Vordergrund dieser Arbeit stand die Charakterisierung der individuellen Funktionen beider miR-122-Zielsequenzen im HCV-Replikationszyklus. Dafür wurden die Erkennungssequenzen so mutiert, dass sie über artifizielle miRNAs separat adressiert werden konnten. Zur Untersuchung der spezifischen Bindung der modifizierten miRNAs an die mutierten Zielsequenzen der HCV-5'-UTR wurde zunächst eine anti-Argonaute 2- (Ago2-) RNA-co-Immunpräzipitation (co-IP) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die miR-122-Erkennungssequenzen separat adressiert werden können und dass nach gemeinsamer Hybridisierung die Bindung beider miRNA/Ago2-Komplexe kooperativ erfolgt. Die Hypothese einer Überkreuz-Bindung der miR-122, bei der die Sequenzen beider Bindungsstellen von einem miR-122-Molekül adressiert werden können, konnte nicht bestätigt werden.

Durch die Verwendung eines HCV-Reporter-Systems mit der HCV-5'-UTR, einem Luciferase-Gen und der viralen 3'-UTR konnte eine kooperative Stimulation der Translation festgestellt werden. Sowohl im Bindungs- als auch im Translationsassay konnte ein stärkerer Effekt der Hybridisierung der miRNA an die erste Bindungsstelle als an die Zweite nachgewiesen werden. Die *in vitro*-Studien zeigten hingegen eine deutlich stärkere Affinität der miR-122 an die zweite Bindungsstelle. Somit ist anzunehmen, dass *in vivo* die Affinität der Bindung der miR-122 an die virale RNA durch Proteine im miRNA-Protein- (miRNP-) Komplex und durch Strukturen der HCV-IRES beeinflusst wird.

Darüber hinaus wurde die Gesamt-RNA-Stabilität und die Integrität des 5'-Endes der HCV-Reporter-RNAs untersucht. Überraschenderweise konnte kein miR-122-abhängiger Effekt nach separater oder gemeinsamer Adressierung der Erkennungssequenzen auf die Stabilität oder Integrität der HCV-5'-UTR-RNA bis zu 36 h nach Elektroporation nachgewiesen werden. Da jedoch frühere Studien mit kompletten HCV-Genomen einen Effekt der miR-122 auf die HCV-RNA-Stabilität gezeigt haben, ist zu vermuten, dass Bestandteile des HCV-Genoms an der Stabilitätskontrolle der viralen RNA beteiligt sind.

Summary

The Hepatitis C Virus (HCV) belongs to the family of *Flaviviridae* and contains a single stranded RNA genome in positive-sense orientation. The genome consists of the open reading frame (ORF), which encodes a polyprotein, and of two highly structured untranslated regions (UTRs). The 5'- and 3'-UTR flank the ORF and are necessary for viral translation and replication. The internal ribosome entry site (IRES) of the HCV 5'-UTR is indispensable for the initiation of translation. In addition, there are two conserved microRNA-122 (miR-122) binding sites near the 5'-end of the 5'-UTR. It has been demonstrated that binding of miR-122 to these binding sites enhances HCV RNA replication and translation as well as stability of the viral RNA.

In this work the individual functions of both miR-122 target sites in the HCV life cycle were in focus. For the experimental studies the binding sites were differently mutated and separately addressed by artificial miRNAs. To analyze the specific binding of the modified miRNAs to their mutated target sites in the HCV 5'-UTR, an anti-Argonaute 2- (Ago2-) co-IP was performed. The results showed that the miR-122 binding sites are separately addressable, and the binding of the miRNA/Ago2-complexes bind in a cooperative way when both sites are addressed in combination.

The hypothesis concerning a cross-over binding of miR-122 to both target sites, in the way that both binding sites can be addressed by only one molecule of miR-122, was not confirmed.

Through the use of a HCV reporter system with the viral 5'-UTR, a luciferase coding sequence and the viral 3'-UTR it has been shown that the cooperative effect of miR-122 action on the HCV 5'-UTR was also observed for the stimulation of viral translation. In both, the binding and the translation assay, the affinity of the miRNA to the first site is much higher than the affinity to the second target site. In contrast, the *in vitro* studies revealed a stronger hybridization of miRNA to the second binding site. Hence, it can be assumed that the affinity of the miR-122 binding is possibly influenced *in vivo* by proteins of the miRNA-protein-complex (miRNP) and by HCV IRES structure.

Moreover, the overall stability of the HCV-RNA as well as the integrity of the 5'-end of the HCV reporter RNAs was analyzed. Surprisingly, there was no miR-122-dependent effect on the viral RNA stability and on the 5'-terminus integrity after separate and common addressing of the target sites up to 36 h after electroporation. In face of previous studies with full-length HCV genomes, where a miR-122-dependent effect on the overall stability has been proven, it must be considered that further features of the viral genome may be required for the stability control of the HCV RNA.

Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha
@	auffüllen mit
° C	Grad Celsius
λ	Lambda
μ	mikro (10^{-6})
%	Prozent
A	Ampere oder Adenin
Ago	Protein der Argonaute Familie
AmpR	Ampicillin-Resistenz
apo	Apolipoprotein
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AP	Anodenpuffer
AUG	Nukleotid-Basentriplett; Start-Kodon der Translation
bp	Basenpaar(e)
BVDV	Bovines Virusdiarrhoe-Virus
c	<i>centi</i> (zenti) (10^{-2})
C	Cytosin
ca.	<i>circa</i>
CD81	<i>Cluster of Differentiation 81</i>
Cl ⁻	Chlorid-Ionen
CLDN1	Claudin-1
CRE	<i>cis</i> -agierendes Replikationselement
cRNA	<i>Cellular</i> (zelluläre) <i>RNA</i>
DAA	<i>direct-acting antivirals</i> (direkt-agierende anti-virale Medikamente)
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
ddH ₂ O	Bi-distilliertes Wasser
DGRC8	<i>DiGeorge syndrome critical region 8</i>
DLS	<i>Dimerization linkage sequence</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonukleinsäure-Endonuklease
dNTP	Desoxyribonukleinsäure-Triphosphat
ds	doppelsträngig

DTT	Dithiothreitol
E	<i>Envelope protein</i> (Hüllprotein)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
ER	Endoplasmisches Retikulum
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (fötales Rinderserum)
FLuc	<i>Firefly Luciferase</i>
G	Guanin
GAG	Glycosaminoglykane
GDP	Guanosindiphosphat
Gemin5	Gem-assoziertes Protein 5
GTP	Guanosintriphosphat
h	<i>hour</i> (Stunde)
HAV	Hepatitis A Virus
HCC	<i>Hepatocellular carcinoma</i> (Leberzellkarzinom)
HCl	Chlorsäure
HCV	Hepatitis C Virus
HCVcc	<i>HCV derived from cell culture</i> (infektiöses HCV-System)
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HDVrz	Hepatitis Delta Virus Ribozym
HeLa	Henrietta Lacks
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
hnRNP	Heterogenes nukleares Ribonukleoprotein
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
hRLuc	Humanisierte <i>Renilla Luciferase</i>
HuH	<i>Human hepatocarcinoma</i>
IFN α	Interferon alpha
IMP-1	<i>Insulin-like growth factor-II mRNA-binding protein 1</i>
IP	Immunpräzipitation
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i> (interne Ribosomen-Bindungsstelle)
ITAF	IRES trans-agierender Faktor

JFH	Japanische Fulminante Hepatitis
K	Kontrolle
kb	Kilobasen
K_d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KH	hnRNP K homologe Domäne
KOH	Kaliumhydroxid
KP	Kathodenpuffer
l	Liter
L2000	Lipofectamine 2000
LB	Lennox Broth
LD	<i>Lipid droplet</i>
LDL(-R)	<i>Low density lipoprotein</i> (-Rezeptor)
LNA	<i>Locked nucleic acid</i>
LSm	<i>Like SM protein</i>
LVP	Lipo-Viro-Partikel
m	milli (10^{-3}) oder Meter
M	Molar [mol/l] oder Mock-Kontrolle
$m^7(P_3)G$	7-Methyl-Guanosin-Kappe
mat	<i>mature</i>
MFE	Minimale freie Energie
Mg^{2+}	Magnesium-Ion
min	Minute
miR(NA)	microRNA
miR*	Gegenstrang von microRNA-Duplexen
miRNP-Komplex	microRNA-Protein-Komplex
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA
mut	mutiert
MV	Molares Verhältnis
NA	<i>Nucleic acid</i> (Nukleinsäure)
NaOH	Natriumhydroxid
NP-40	Nonidet P-40
NS	Nicht-Strukturprotein
NSAP1	NS1-assoziiertes Protein
nt	Nukleotid(e)
NTP	Nukleosid-Triphosphat

OCLN	Occludin
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
p	piko (10^{-12})
P	Phosphat
PABP	poly(A)-Bindungsprotein
PACT	<i>Protein kinase R-associated activator</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAZ	Piwi Argonaute und Zwillie
<i>P-body</i>	<i>Processing body</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCBP2	Poly(C)-bindendes Protein 2
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
p.e.	post-Elektroporation
PEG	Polyethyleneglykol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin-Lösung
pH	Negative dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)
piRNA	<i>Piwi-interacting RNA</i>
PIWI	<i>P-element induced wimpy testis</i>
PK	Pseudoknoten
PLB	Passiver Lyse-Puffer
Pol	Polymerase
pre	<i>precursor</i> (Vorläufer)
pri	primär
PTB	<i>Polypyrimidine tract-binding protein</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
<i>py</i>	Polypyrimidin-Bereich
Ran	RAs-related Nuclear protein
RBV	Ribavirin
RC	<i>Replication complex</i> (Repikations-Komplex)
RdRp	RNA-dependent- (abhängige-) RNA-Polymerase
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	RNA-Endonuklease
RPA	<i>Ribonuclease Protection Assay</i>
rNTP	Ribonukleinsäure-Triphosphate

rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RRM	<i>RNA recognition motif</i> (RNA-Erkennungsmotiv)
rUTP	Uridine-Triphosphat
S	Sonde
S1	S1-Aptamer
S1(m)/S2(m)/S3(m)	<i>Site</i> (Erkennungssequenz) 1–3 (mutiert)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodekylsulfat)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SL	<i>Stem loop</i>
SR-BI	Scavenger Rezeptor Klasse B Typ I
ss	<i>single stranded</i> (einzelsträngig)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	<i>Tris buffered saline</i> mit Tween20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFP	Transformations-Puffer
T _m	Schmelztemperatur
TNRC6B	<i>Trinucleotide Repeat Containing 6B</i>
TRBP	<i>HIV-1 TAR RNA binding protein</i>
tRNA	Transfer-RNA
Met-tRNA _i	Methionin-tragende Initiator-tRNA
U	Unit oder Uracil
u.a.	unter anderem
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
v/v	Volumen/Volumen
VR	Variable Region
w/v	Gewicht/Volumen
WHO	<i>World health organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)
wt	Wildtyp
wt _{mod}	Wildtyp modifiziert
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Das Hepatitis C Virus	1
1.1.1 Klassifizierung von HCV	2
1.1.2 Struktur und Genom-Organisation	2
1.1.2.1 Aufbau der 5'-UTR und ihre Funktion	4
1.1.2.2 Aufbau der 3'-UTR und ihre Funktion	4
1.1.2.3 CRE-Element	5
1.1.2.4 Proteine des offenen Leserasters und ihre Funktion	5
1.1.3 HCV-Lebenszyklus	7
1.1.3.1 Rezeptor-Bindung und Eintritt in die Wirtszelle	8
1.1.3.2 Translation und Replikation der HCV-RNA	9
1.1.3.3 Bildung reifer Viruspartikel und Austritt aus der Zelle	10
1.2 Molekulare Mechanismen der Translationsinitiation	11
1.2.1 Cap-abhängige Initiation der Translation	13
1.2.2 HCV-IRES-abhängige Initiation der Translation	14
1.2.3 IRES <i>trans-acting factors</i> (ITAFs) und ihre Funktionen	15
1.3 microRNAs	16
1.3.1 Biogenese und Funktion von miRNAs	17
1.3.2 Die leberspezifische miR-122	20
1.3.3 Der Einfluss der miR-122 auf den HCV-Infektionszyklus	20
1.4 Ziele der Arbeit	23
2 Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.1.1 Bakterienstämme	24
2.1.2 Zelllinien	24
2.1.3 Nukleinsäuren	24
2.1.3.1 Plasmide	24
2.1.3.2 Oligonukleotide	25
2.1.3.2.1 DNA-Oligonukleotide	25
2.1.3.2.2 RNA-Oligonukleotide	27
2.1.4 Nukleotide	27
2.1.5 Enzyme	27
2.1.6 Größenstandards	28
2.1.6.1 DNA-Größenstandards	28
2.1.6.2 Protein-Größenstandards	28
2.1.7 Antikörper und Magnetische Beads	28
2.1.8 Kits	29

2.1.9	Chemikalien und Reagenzien	29
2.1.10	Puffer	30
2.1.10.1	Kulturbedien und Puffer.....	30
2.1.10.2	Gel-Puffer.....	31
2.1.10.3	Nukleinsäure-Probenpuffer	32
2.1.10.4	Co-IP-Puffer.....	32
2.1.10.5	SDS-PAGE-Puffer.....	33
2.1.10.6	Western Blot-Puffer.....	33
2.1.10.7	Puffer für die Elektroporation.....	34
2.1.10.8	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> -Puffer.....	34
2.1.10.9	<i>RNase Protection Assay</i> -Puffer.....	35
2.1.11	Spezielle Verbrauchsmaterialien	35
2.1.12	Geräte.....	36
2.2	Methoden	38
2.2.1	Mikrobiologische Methoden	38
2.2.1.1	Bakterienstämme	38
2.2.1.2	Kultivierung von <i>E.coli</i> -Stämmen	38
2.2.1.3	Transformation von <i>E.coli</i> Stämmen	38
2.2.1.3.1	Herstellung von chemisch kompetenten Zellen.....	38
2.2.1.3.2	Calciumchlorid-Transformation von DNA in kompetente Zellen.....	39
2.2.2	Arbeiten mit DNA	39
2.2.2.1	DNA-Synthese	39
2.2.2.1.1	Standard Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
2.2.2.1.2	Präparative PCR	40
2.2.2.2	Modifikation von DNA (Mutagenese und Klonierung).....	41
2.2.2.2.1	Zielgerichtete Mutagenese mittels PCR.....	41
2.2.2.2.2	Enzymatische Modifikation von DNA	42
2.2.2.2.2.1	Restriktionsverdau von DNA	42
2.2.2.2.2.2	Entfernung von 5'-Phosphatresten (Dephosphorylierung).....	43
2.2.2.2.2.3	Ligation von DNA Fragmenten.....	43
2.2.2.3	Präparation und Konzentrierung von DNA	43
2.2.2.3.1	Plasmid-DNA-Minipräparation.....	43
2.2.2.3.2	Plasmid-DNA-Maxipräparation.....	44
2.2.2.3.3	Reinigung von DNA-Fragmenten über präparative Agarosegele	44
2.2.2.3.4	Reinigung und Konzentrierung von DNA-Matrizen für die <i>in vitro</i> -Transkription	45
2.2.2.3.4.1	Proteinase K-Verdau	45
2.2.2.3.4.2	Phenol/Chloroform-Extraktion	45
2.2.2.3.4.3	Alkoholfällung von Nukleinsäuren (Präzipitation).....	46
2.2.3	Arbeiten mit RNA	46
2.2.3.1	RNA-Synthese	46
2.2.3.1.1	Herstellung von DNA-Matrizen für die <i>in vitro</i> -Transkription	46
2.2.3.1.2	Standard <i>in vitro</i> -Transkription mit T7-RNA-Polymerase	47
2.2.3.1.3	<i>In vitro</i> -Transkription von radioaktiv markierter RNA.....	48
2.2.3.1.4	Synthese von RNA mit 5'-Cap-Nukleotid	49
2.2.3.2	Präparation und Reinigung von RNA	49
2.2.3.2.1	DNase I-Verdau	49

2.2.3.2.2	Reinigung von RNA über <i>GeneJet RNA Cleanup</i> -Säulen.....	49
2.2.3.2.3	Präparative denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese	50
2.2.3.3	Hybridisierung von RNA	50
2.2.3.3.1	Herstellung von microRNA-Duplexen.....	50
2.2.4	Nachweis von Nukleinsäuren.....	51
2.2.4.1	Fluorometrische Konzentrationsbestimmung (Qubit®).....	51
2.2.4.2	Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	51
2.2.4.3	Elektrophorese	51
2.2.4.3.1	Analytische Agarosegel-Elektrophorese	51
2.2.4.3.2	Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese zur Auftrennung von RNA	52
2.2.5	Zellkultur-Methoden	53
2.2.5.1	Verwendete Zelllinien.....	53
2.2.5.2	Auftauen und Einfrieren von Zellen	53
2.2.5.3	Passagieren von adhärenenten eukaryotischen Zellen.....	54
2.2.5.4	Zählen von eukaryotischen Zellen mittels Neubauer Zählkammer	54
2.2.5.5	Aussäen von adhärenenten eukaryotischen Zellen für Tansfektionen	55
2.2.5.6	Transfektion von Reporter-RNAs	56
2.2.5.6.1	(Co-)Transfektion mittels Lipofektion.....	56
2.2.5.6.2	(Co-)Transfektion mittels Elektroporation	56
2.2.6	Proteinbiochemische Methoden.....	57
2.2.6.1	Argonaute-Protein-spezifische RNA-co-Immunpräzipitation (Ago-co-IP)	57
2.2.6.2	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	59
2.2.6.3	Western Blot.....	60
2.2.6.4	Nachweis der Expression von Reporter-Proteinen (Luciferase-Assay).....	61
2.2.7	Biochemische Methoden zur Analyse von RNA.....	62
2.2.7.1	Electrophoretic Mobility Shift Assay	62
2.2.7.1.1	Synthese der [α - 32 P]-markierten Ziel-RNA	63
2.2.7.1.2	Hybridisierung der artifiziellen miRNAs an die HCV-RNA	63
2.2.7.1.3	Detektion der RNA-Hybride.....	63
2.2.7.2	<i>Ribonuclease Protection Assay</i>	64
2.2.7.2.1	Synthese der [α - 32 P]-markierten antisense-RNA.....	65
2.2.7.2.2	Präparation und Reinigung der Ziel-RNA.....	65
2.2.7.2.3	Hybridisierung und RNase-Behandlung der Sonde und Ziel-RNA	66
2.2.7.2.4	Auftrennung und Detektion der geschützten Fragmente zur Quantifizierung	66
2.2.7.2.5	Auftrennung und Detektion der geschützten Fragmente zur Qualifizierung	67
2.2.8	Autoradiographie	67
3	Ergebnisse	68
3.1	Design einer mutierten HCV-5'-UTR mit separat adressierbaren miRNA-Bindungsstellen	68
3.1.1	<i>In silico</i> -Strukturanalysen der modifizierten Wildtyp- und mutieren HCV-5'-UTR	69
3.1.2	Herstellung der mutierten HCV-5'-UTR	71
3.2	Charakterisierung der mutierten miR-122-Bindungsstellen in der HCV-5'-UTR	72
3.2.1	Anti-Ago2-RNA-co-IP zur Überprüfung der spezifischen Bindung der artifiziellen miRNAs an die mutierten Bindungsstellen in der HCV-5'-UTR.....	72

3.2.1.1	Bestimmung der Bindungseffizienz der artifiziellen miRNAs an die separat adressierten Bindungsstellen	77
3.2.2	<i>Electromobility Shift Assay</i> zur Überprüfung der Bindungseigenschaften der jeweils kompensierenden miRNA.....	80
3.2.3	Luciferase-Assay zur Bestimmung der Translationsstimulation durch separat adressierte miRNA-Bindungsstellen.....	83
3.2.4	Effekt der separaten Adressierung der miRNA-Bindungsstellen in der HCV-5'-UTR auf die Stabilität der RNA.....	88
3.2.4.1	Untersuchung der 5'-Integrität transfizierter HCV-RNA nach separater Adressierung der miRNA-Bindungsstellen	94
3.3	Herstellung einer mutierten HCV-5'-UTR mit jeweils nur einer mutierten miR-122-Bindungsstelle	96
3.4	Charakterisierung der einzeln mutierten Bindungsstellen in der HCV-5'-UTR	97
3.4.1	Anti-Ago2-RNA-co-IP zur Bestimmung der Effizienz der Bindung von miR-122 an die Erkennungssequenzen der einzeln mutierten HCV-5'-UTR.....	97
3.4.2	<i>In silico</i> -Strukturanalysen der separat mutierten HCV-5'-UTR	100
3.4.3	Bestimmung der Bindungseffizienz der zweiten adressierten miR-122-Bindungsstelle S2 mittels co-IP	101
3.4.4	Bestimmung der Translationseffizienz bei separater Adressierung der ersten und zweiten Erkennungssequenz der HCV-5'-UTR durch miR-122.....	103
3.5	Exkurs: Überprüfung einer möglichen Überkreuz-Funktion von miR-122.....	107
4	Diskussion	111
4.1	Separate Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-5'-UTR.....	111
4.1.1	Die Affinität des miR-122/Ago2-Komplexes ist <i>in vivo</i> zu S1 höher als zu S2	112
4.1.2	<i>In vitro</i> -Studien zeigen eine stärkere Bindung von miR-122 an S2.....	114
4.1.3	Kooperative Bindung der miR-122/Ago2-Komplexe an die HCV-5'-UTR	115
4.2	Kooperative Stimulation der Translation nach gemeinsamer Adressierung der miR-122-Erkennungssequenzen in der HCV-5'-UTR.....	116
4.3	Einfluss der miR-122 auf die HCV-Genom-Stabilität	117
4.3.1	Die Gesamtstabilität und 5'-Integrität der HCV-IRES ist unabhängig von miR-122/Ago2-Komplexen	119
4.4	Exkurs: Keine Überkreuz-Hybridisierung von miR-122 in der HCV-5'-UTR.....	120
4.5	Modell der individuellen Funktion der miR-122-Erkennungssequenzen in der HCV-5'-UTR und weiterführende Versuche	121
5	Literaturverzeichnis	123
6	Anhang	142
6.1	Plasmidkarten	142
6.1.1	pFL-J6/JFH1	142
6.1.2	pUC18-Con-1-IRES-S1-HDVrz.....	143
6.1.3	pUC18-J6/JFH1-IRES-S1-HDVrz	144
6.1.4	pGEM-4Z-FLuc-Poly(A)	145

6.1.5	pUC18-J6/JFH1-IRES-hRluc-3'-UTR	146
6.1.6	pUC18-J6/JFH1-IRES-SP6rev-S1-HDVrz	147
6.1.7	pGEM-4Z-FLuc-SP6rev-Poly(A)	148
Abbildungsverzeichnis		149
Tabellenverzeichnis		151
Wissenschaftliche Veröffentlichungen		152
Danksagung		153
Eidesstaatliche Erklärung		154

1 Einleitung

1.1 Das Hepatitis C Virus

Das Hepatitis C Virus (HCV) wurde in den 1970ern als das für die *Non-A-Non-B* Hepatitis verantwortliche Agens einer Krankheit definiert, die nicht durch Hepatitis A- oder Hepatitis B-Viren verursacht wurde ^[1]. HCV ist in der Natur ausschließlich in humanen Leberzellen vorzufinden, wodurch es erst 1989 gelang das Virus als solches zu identifizieren und zu klonieren ^[2].

Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind 130–150 Millionen Menschen chronisch mit HCV infiziert, von denen etwa 500.000 pro Jahr an HCV-bedingten Lebererkrankungen sterben ^[3].

Nach einer 2- bis 6-wöchigen Inkubationszeit entwickeln nur etwa 20 % der infizierten Personen überhaupt Symptome, die sehr unspezifisch und grippeähnlich sind: von Fieber, Müdigkeit, Brechreiz, Abdominal- und Gelenkschmerzen und Juckreiz bis hin zur Gelbsucht. Etwa 60–80 % der erkrankten Personen entwickeln eine chronische Infektion, bei denen es langfristig und in ca. einem Drittel der Fälle zu schweren Leberschäden, wie Leberfibrose und –zirrhose, kommen kann, die wiederum das Risiko für ein Leberzellkarzinom (*hepatocellular carcinoma*, HCC) erhöhen können ^[4; 5]. Hepatitis C gilt damit als einer der Hauptursachen für chronische Lebererkrankungen weltweit ^[6].

HCV wird hauptsächlich über Blut-zu-Blut Kontakt verbreitet, assoziiert mit Transfusionen und kontaminiertem medizinischen Equipment. Darüber hinaus spielen Organtransplantationen und intravenöser Drogenkonsum eine große Rolle.

Die Infektion mit HCV unterscheidet sich von denen anderer chronisch-viraler Infektionen wie HIV. Es ist unter anderem (u.a.) bislang das einzig bekannte RNA Virus, dass, ohne ein Retrovirus zu sein, eine chronische Infektionskrankheit verursachen kann. Ein weiterer Unterschied ist, dass die Infektion durch frühzeitige Therapie behandelt werden kann. Bereits etablierte Therapeutika sind zum einen eine Kombination aus Polyethylenglykol-gebundenem Interferon alpha (PEG-IFN α) und dem Nukleosid-Analogon Ribavirin (RBV), und zum anderen sogenannte *direct-acting antivirals* (DAAs). Diese interagieren direkt mit viralen Proteinen, können oral eingenommen werden und zeigen innerhalb von 12–24 Wochen eine 90 %-ige Heilungsrate. Zu beachten ist jedoch, dass bei Patienten auch nach einer Heilung die Wahrscheinlichkeit eine Zirrhose oder ein HCC zu entwickeln erhöht bleibt. Bis heute ist dennoch keine geeignete Impfung gegen HCV verfügbar ^[3].

1.1.1 Klassifizierung von HCV

Das Hepatitis C Virus wurde aufgrund von Sequenzanalysen und dem Vergleich mit den Proteinsequenzen anderer RNA-Viren in die Gattung *Hepacivirus* in die Familie der *Flaviviridae* eingeordnet ^[7]. Weitere Gattungen dieser Familie sind *Flavivirus*, benannt durch das namensgebende Gelbfieberevirus, *Pestivirus* (u.a. *bovine viral diarrhea virus*, BVDV) und *Pegivirus* (GB-Viren). Neben HCV wird nur noch das GB-Virus B, als einziges der GB-Viren, den Hepaciviren zugeordnet ^[8].

HCV steht in engerer phylogenetischer Beziehung zu Pestiviren als zu Flaviviren ^[9]. Bei Betrachtung der Organisation der hoch strukturierten 5'-untranslatierten (5'-UTR) Region von Pestiviren und HCV weist diese eine längere Sequenz mit mehreren AUG-Kodons auf und zeichnet sich durch das Fehlen einer Cap-Struktur aus ^[10; 11]. Im Gegensatz dazu besitzen Flaviviren eine relativ kurze 5'-UTR-Sequenz von bis zu 132 Nukleotiden (nt) ohne AUG-Basentriplets. Zudem verwendet die Gattung einen Cap-abhängigen Translationsmechanismus ^[12; 13]. Kennzeichnend für alle *Flaviviridae* ist jedoch ein einzelsträngiges positiv-orientiertes RNA-Genom, umhüllt von Virus-eigenen Proteinen.

Aufgrund der hohen Mutationsrate, verursacht durch die fehlende 3'-5'-Exonuklease-Überprüfungsfunktion der RNA-abhängigen RNA-Polymerase während der Replikation von HCV, existiert eine große Anzahl genetisch heterogener Isolate, die in sieben Genotypen und diverse Subtypen (z.B. Genotyp 1, Subtyp a (1a)) unterteilt wurden ^[14; 15]. Die Subtypen wiederum zeigen unterschiedliche geographische Verbreitungen und können der Infektion bestimmter Risikogruppen zugeordnet werden. So kommen die Genotypen 1b, 2a und 2b hauptsächlich in Europa und Asien im Zusammenhang mit Bluttransfusionen vor, während z.B. Genotyp 3a zusammen mit 1a durch Injektionen bei Drogenkonsum in Nordeuropa verbreitet werden. Die Isolate 1a und 1b sind dabei die häufigsten Subtypen in Europa ^[16].

Je nach Genotyp werden von der WHO unterschiedliche Therapien vorgeschlagen, die zudem abhängig vom Grad der Infektion (chronisch versus nicht-chronisch) sind. Die Heilungschancen sind dabei unterschiedlich hoch ^[3].

1.1.2 Struktur und Genom-Organisation

Morphologisch betrachtet zeichnet sich das 50–80 nm große HCV-Partikel durch ein 9,6 Kilobasen (kb) großes, einzelsträngiges (ss) RNA-Genom in positiver Polarität (+) aus ((+) ss RNA), welches sich in einem Nukleokapsid befindet. Das Kapsid wird aus den viralen Core-Proteinen gebildet. Umschlossen wird das Virus von einer Lipidmembran zellulären Ursprungs, in die weitere virale Proteine eingelagert sind, nämlich die Glykoproteine E1 und E2 (Abbildung 1.1). ^[17; 18]

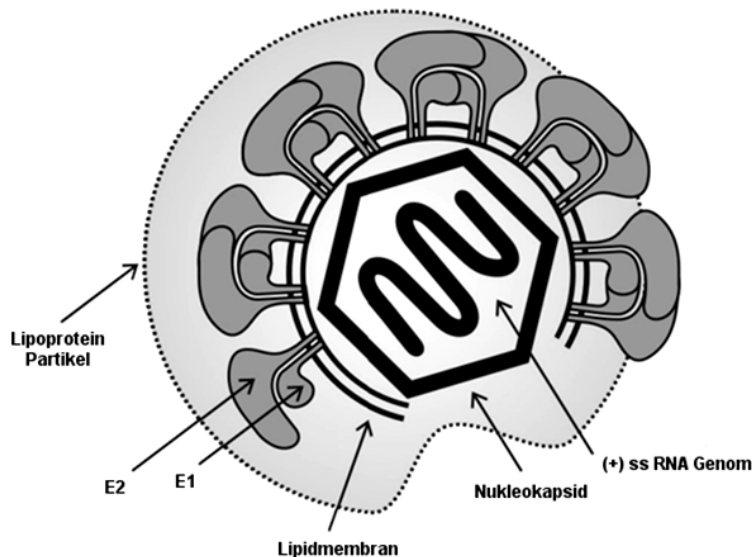


Abbildung 1.1: Struktur eines HCV-Partikels. Das HCV-Partikel besteht aus einer wirtszellstammenden Lipidmembran mit den eingelagerten viralen Glykoproteinen E1 und E2 und dem darunter befindlichen Nukleokapsid aus Core-Proteinen, welches wiederum die genomische einzelsträngige RNA ((+) ss RNA) umhüllt. Das Partikel ist an ein Lipoprotein assoziiert. Modifiziert von ^[19].

Die aus der Leberzelle austretenden HCV-Partikel werden auch als Lipo-Viro-Partikel (LVP) bezeichnet, weil sie an triglyceridreiche Lipoproteine gebunden sind, wie VLDL (*very low density lipoprotein*) und LDL (*low density lipoprotein*), und können als solche im Patientenserum nachgewiesen werden ^[20; 21]. Die LVP können mit verschiedenen Apolipoproteinen (apo) assoziiert sein, wie z.B. apoE, apoB und einige apoC Proteine ^[22–24]. Dieser Mechanismus soll das Anheften an eine neue Wirtszelle erleichtern ^[25; 26]. Es ist aber bereits bekannt, dass sich HCV, als bisher einziges Virus, den Lipidmetabolismus des Wirtes an vielen Stufen seines Vermehrungszyklus zunutze macht ^[27].

Das lineare HCV-Genom setzt sich aus einem einzigen offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF), kodierend für ein Polyprotein, zusammen. Dieser Bereich wird von zwei strukturreichen untranslatierten Regionen (UTRs) am 5'- und 3'- Ende der RNA flankiert (Abbildung 1.2). Die UTRs der viralen RNA enthalten sogenannte *cis-acting elements*, hoch strukturierte Bereiche, die an der Translation und Replikation direkt beteiligt sind.

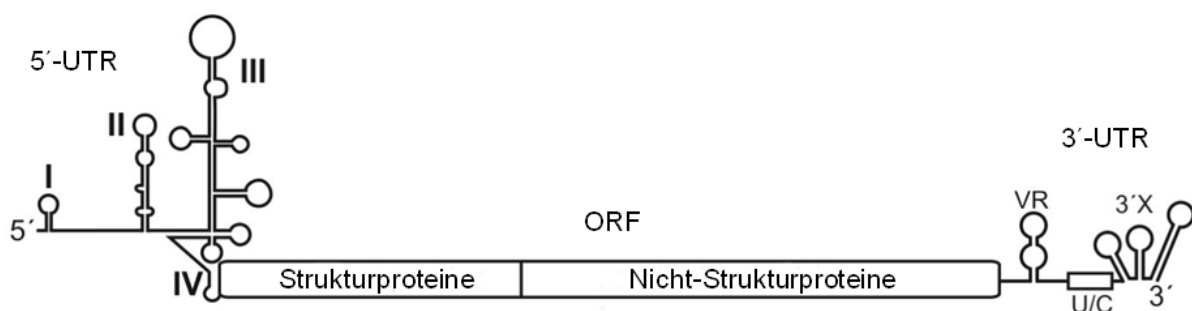


Abbildung 1.2: Genomische Organisation von HCV. Schematische Darstellung der Struktur der 9.6 kb großen positiv-Strang-RNA von HCV. Gezeigt sind dabei die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen (UTRs) sowie der *open reading frame* (ORF), kodierend für Struktur- und Nicht-Strukturproteine. Die 5'-UTR ist durch vier stark strukturierte Domänen charakterisiert (I–IV). Die 3'-UTR ist in drei unterschiedliche Bereiche unterteilt: die variable Region (VR), einen langen, variablen poly(U/C)-Bereich und eine hoch konservierte 3'-Region (3'X). Verändert nach der Dissertation von D. Conrad, 2013.

1.1.2.1 Aufbau der 5'-UTR und ihre Funktion

Die HCV-5'-UTR ist eine der stärksten konservierten Regionen des Genoms und besitzt vier stark strukturierte Bereiche (Abbildung 1.2, Abbildung 1.3), nummeriert von I bis IV (*stem loop* I–IV, SLI–SLIV), bestehend aus zahlreichen Haarnadelstrukturen und einer sogenannten *pseudoknot*-Region^[11; 28; 29]. Die Haarnadelstruktur I und teilweise Bereiche von Struktur II sind bei der Replikation von HCV beteiligt^[30; 31]. Die Domänen II, III und IV zusammen mit den ersten 20–40 nt der Core-kodierenden Sequenz bilden die *internal ribosome entry site* (IRES) (Abbildung 1.3)^[30; 32]. Die HCV-IRES dient der Cap-Nukleotid-unabhängigen Initiation der Translation^[28; 32] durch die Bindung zellulärer Faktoren und der 40S ribosomalen Untereinheit in der Nähe des ORF-Start-Kodons^[33; 34].

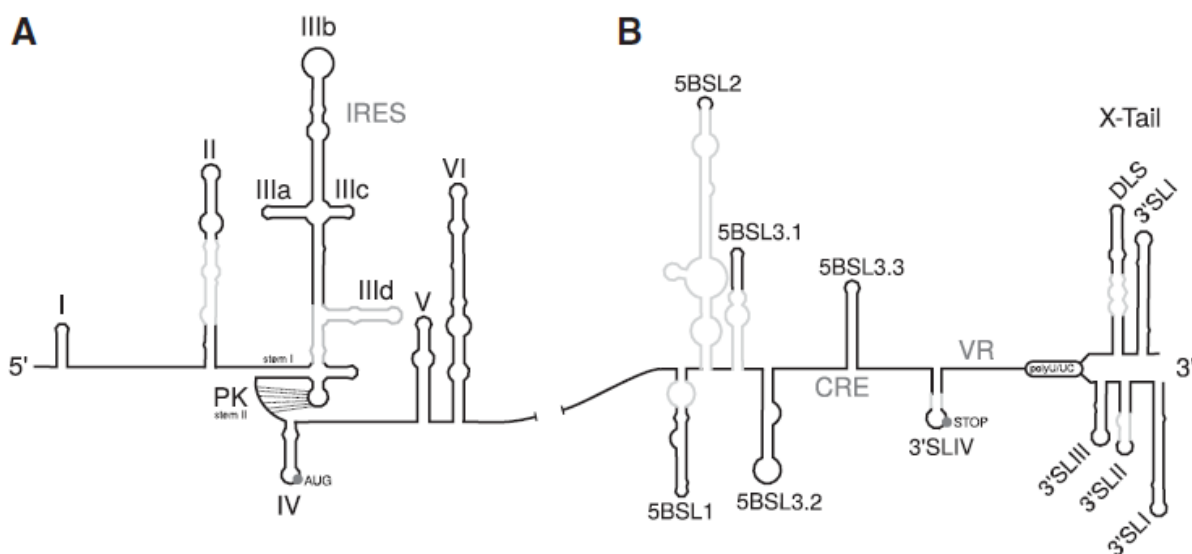


Abbildung 1.3: Struktur der HCV-5'- und -3'-UTR sowie der CRE-Region. Darstellung wichtiger bereits bekannter (schwarz) und neuer (grau) RNA-Haarnadelstrukturen des HCV-RNA-Genoms. (A) 5'-UTR und Core-kodierende Strukturen V und VI der Plusstrang-RNA. (B) *Cis-acting replication element* (CRE-) Region und 3'-UTR des viralen Plusstrangs. Die 3'-UTR weist zwei alternative Strukturen in der 3'-X-Region (X-Tail) auf: zum einen die *dimerization linkage sequence* (DLS) und die Domäne 3'SLI (oben) und zum anderen die Haarnadelstrukturen 3'SLI–3'SLIII (unten). IRES: *internal ribosome entry site*, PK: *pseudoknot*, AUG: Start-Kodon, VR: variable Region.^[35]

1.1.2.2 Aufbau der 3'-UTR und ihre Funktion

Die ebenfalls strukturierte 3'-UTR besteht aus etwa 225 nt, die in drei Bereiche unterteilt werden können (Abbildung 1.3): eine variable Region (VR) von ca. 30–40 nt, einen langen, variablen poly(U/C)-Bereich (30–90 nt) und eine hoch konservierte 3'-Region (3'X, X-Tail) aus 98 nt^[36; 37]. Die 3'X-Region kann in zwei verschiedenen Strukturen vorliegen: die erste Faltung besteht aus drei Haarnadelstrukturen (SLI–SLIII; von 3'- in 5'-Richtung)^[38], die zusammen mit den Sequenz-aufwärts gelegenen 25 nt des poly(U/C)-Bereichs für die RNA-Replikation entscheidend sind, während die restliche Sequenz der 3'-UTR die Effizienz der

viralen Replikation weiter steigert ^[39; 40]. Die zweite Faltung wird von der bereits erwähnten Haarnadelstruktur SLI und der sogenannten *dimerization linkage sequence* (DLS) bestimmt, von der vermutet wird, dass sie für die Dimerisierung der viralen RNA verantwortlich ist und möglicherweise auch zur Verpackung des Genoms ins Nukleokapsid beteiligt ist ^[35; 41; 42]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die 3'-UTR an der Stimulation der Translation beteiligt ist ^[43; 44].

1.1.2.3 CRE-Element

Neben der 5'- und 3'-UTR existiert noch ein sogenanntes *cis-acting* Replikationselement (CRE) in der C-terminalen Region der NS5B-kodierenden Sequenz ^[45]. Dort befindet sich eine von insgesamt fünf Haarnadelstrukturen, genannt 5BSL3.2 (Abbildung 1.3), welche an der RNA-Replikation beteiligt ist ^[46–48]. Der apikale Teil dieser Struktur interagiert dabei mit SLII der 3'X-Region der 3'-UTR, wodurch sich eine *pseudoknot*-Struktur in Folge der RNA-RNA-Interaktion ausbildet. Zudem kann die interne Ausbuchtung von 5BSL3.2 entweder mit der in der IRES befindlichen Schleife von SLIIId ^[49] oder aber mit dem Bereich zwischen 5BSL1 und 5BSL2 interagieren ^[48]. Beide Interaktionen der 3'X-Region mit Sequenzen innerhalb der 3'-UTR lassen vermuten, dass diese am Wechsel von Translation zu Replikation im HCV-Replikationszyklus beteiligt sind ^[50]. Die Bestimmung weiterer sogenannter *long-range interactions* zwischen 5'- und 3'-UTR sowie von Strukturen innerhalb dieser Regionen erfolgte bisher nur *in silico* ^[35].

1.1.2.4 Proteine des offenen Leserasters und ihre Funktion

Die Translation des HCV-ORF führt zur Produktion eines Polyproteins, welches durch zelluläre und virale Proteasen co- und post-translational prozessiert wird (Abbildung 1.4). Dabei entstehen zehn voll funktionsfähige virale Proteine: die Strukturproteine Core, E1 und E2 und die Nicht-Strukturproteine p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B. Die Strukturproteine sowie das p7-Polypeptid werden proteolytisch von der Signalpeptidase des Endoplasmatischen Retikulums (ER) gespalten, während die restlichen sechs von den viralen Proteasen NS2-3 und NS3-4A prozessiert werden. Das Core-Protein wird darüber hinaus am C-Terminus durch die Signalpeptidase geschnitten. ^[37; 51; 52]

Das stark basische Core-Protein bildet nach vollständiger Reifung das Nukleokapsid des Viruspartikels ^[53]. Zudem bindet es die virale RNA und trägt durch eine RNA-Chaperon-Aktivität zur Verpackung des Genoms bei ^[54]. Die Assoziation von Core mit sogenannten *lipid droplets* (LDs) ^[55; 56] und die Interaktion mit dem RNA-bindenden Protein NS5A ^[57] spielen dabei eine zentrale Rolle.

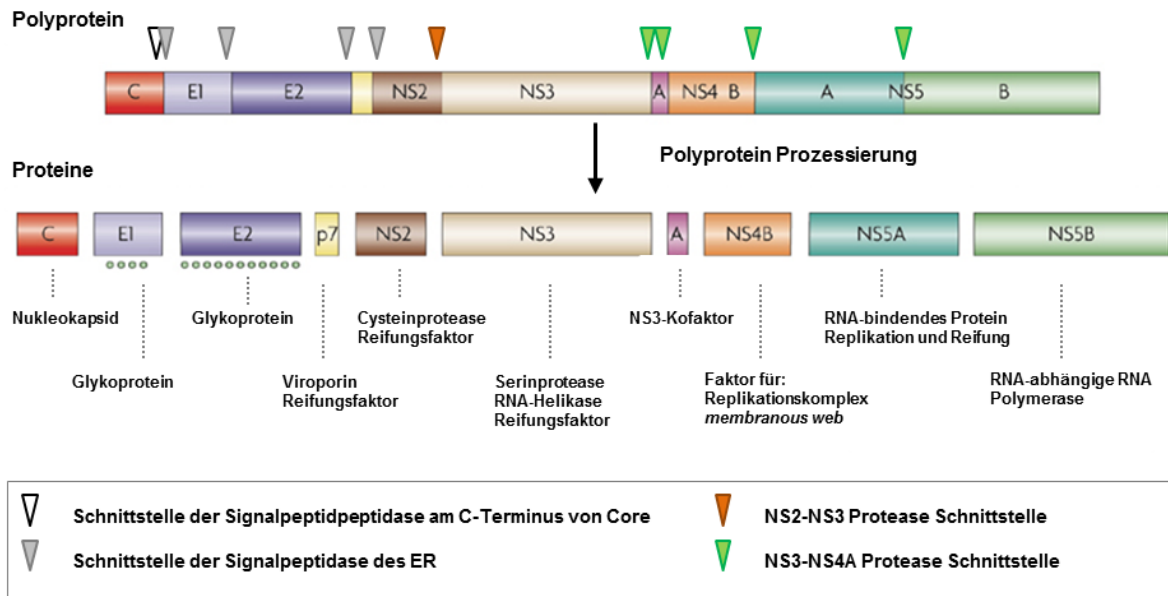


Abbildung 1.4: Polyprotein-Prozessierung von HCV. Nach *internal ribosome entry site* (IRES)-abhängiger Translation wird das resultierende Polyprotein co- und post-translational in zehn Einzelproteine prozessiert. Davon sind Core, E1 und E2 strukturbildende Proteine; p7, NS2-NS5B sind Nicht-Strukturproteine. Die Spaltung erfolgt zum einen durch zelluläre Enzyme (weißes und graues Dreieck) und zum anderen über die Aktivität viraler Proteasen (NS2-3 (orangenes Dreieck), NS3-4A (grünes Dreieck)). Modifiziert nach ^[58].

Die Typ-I-Transmembranproteine E1 und E2 spielen eine große Rolle beim Zusammenbau des Viruspartikels, beim Eintritt in die Wirtszelle ^[59] und der Fusion mit der endosomalen Membran ^[60]. In reifen extrazellulären Viruspartikeln (Virionen) bilden diese glykosylierten Proteine große kovalente Komplexe aus, die über Disulfidbindungen stabilisiert werden ^[61]. Dies lässt vermuten, dass laterale Protein-Protein-Interaktionen eine Rolle bei der Freisetzung von HCV aus der Wirtszelle spielen.

Das stark hydrophobe Polypeptid p7 ist ein kleines integrales Membranprotein. Dieses fungiert als Ionenkanal und leistet einen Beitrag zur Virusproduktion, wodurch es der Viroporin Familie zugeordnet werden kann ^[62; 63]. Es interagiert mit den Strukturproteinen Core, E1 und E2 sowie dem Nicht-Strukturprotein NS2, um seine Funktionen ausüben zu können ^[64–67]. Dennoch ist die exakte Funktion dieses Ionenkanals bei der Viruspartikel-Produktion und -Freisetzung noch ungeklärt.

Die Nicht-Strukturproteine NS2 bis NS5B sind wichtig für die Replikation der viralen RNA ^[68] und werden über zwei virale Proteasen zu funktionsfähigen Proteinen gespalten. Die Cystein-Protease wird durch NS2 kodiert, wobei die enzymatische Funktion stark durch den N-terminalen Bereich der NS3-kodierenden Region gesteigert wird ^[69]. Die nachfolgende autoproteolytische Spaltung der NS2-NS3-Bindungsstelle ist essentiell zur Generierung eines voll funktionsfähigen NS3 Proteins. Dieses Protein bildet, zusammen mit dem Co-Faktor NS4A, ein multifunktionelles Enzym (NS3-NS4A), welches im N-terminalen Teil seiner

Sequenz eine Serinprotease trägt, die zur Prozessierung der restlichen viralen Proteine benötigt wird (Abbildung 1.4) ^[70]. Im C-terminalen Bereich befindet sich eine NTPase/RNA-Helikase-Aktivität, die bei der HCV-RNA-Replikation eine essentielle Rolle spielt ^[71].

NS4B ist ein hydrophobes Transmembranprotein. Es induziert die Bildung des sogenannten *membranous web*, einer spezifischen Membranveränderung, bestehend aus lokal abgegrenzten Membranvesikeln, die wiederum als Grundgerüst des HCV-Replikationskomplexes dienen ^[19; 72; 73]. NS4B bindet die virale RNA und interagiert mit anderen nicht-strukturellen viralen Proteinen ^[74]. Darüber hinaus konnte bei diesem Protein eine NTPase-Aktivität und eine Beteiligung beim Zusammenbau der Partikel nachgewiesen werden ^[75; 76]. NS4B interagiert darüber hinaus entweder direkt oder indirekt mit zahlreichen zellulären Proteinen, die an der Regulation des Lipidmetabolismus, der zellulären Immunantwort oder der Tumorbildung beteiligt sind ^[77].

NS5A ist ein Membran-assoziiertes Phosphoprotein, welches aufgrund seines Phosphorylierungszustandes, reguliert durch zelluläre Kinasen, eine große Rolle in der Modulation der HCV-RNA-Replikation und der Partikelbildung spielt ^[78; 79].

Das Schlüsselenzym der RNA-Replikation ist das letzte Protein im ORF, die NS5B RNA-anhängige RNA-Polymerase (RdRp) ^[80–82]. Sie nutzt die positiv-orientierte, einzelsträngige RNA als Matrize zur *de novo*-Synthese weiterer (+) ss RNA-Stränge, über Negativstrang-RNA-Intermediate. NS5B wird auch als *tail-anchored* Protein bezeichnet, da es post-translational integral in die ER-Membran assoziiert wird, wobei sich die katalytische Domäne zytosolisch orientiert befindet ^[83]. Der NS5B-Membran-Anker ist dabei unabdingbar für die Replikation ^[84].

1.1.3 HCV-Lebenszyklus

HCV infiziert hauptsächlich Leberzellen *in vivo*. Dieser Tropismus konnte auch in *in vitro*-Experimenten gezeigt werden ^[85]. Zudem weist HCV eine sehr hohe Wirtsspezifität zu Menschen und Schimpansen auf, sodass lange Zeit, aufgrund fehlender geeigneter Tiermodelle, auf die bisherigen Angaben der Infektionszyklen nah verwandter Mitglieder der Flavi- und Pestiviren zurückgegriffen wurde. Erst 1999 konnte durch die Entwicklung eines Replikonsystems aus autonom-replizierenden, subgenomischen HCV-RNAs in humanen Hepatomazellen (HuH-7), das Wissen um den HCV-Lebenszyklus erweitert werden ^[68]. Zudem ebnete die Identifikation eines neuen HCV-Isolates, genannt JFH (*japanese fulminant hepatitis*)-1 (JFH1), den Weg zur Produktion infektiöser Viruspartikel in Zellkultur und ermöglichte dadurch die Identifikation weiterer Schritte im Infektionszyklus von HCV ^[86].

Der Lebenszyklus von HCV lässt sich grob in acht Schritte unterteilen, die in Abbildung 1.5 dargestellt sind. Das Virus heftet zunächst an die Wirtszelle an und gelangt über Rezeptor-

vermittelte Endozytose ins Zytoplasma des Hepatozyten. Dort wird die genomische RNA ins Zytosol entlassen und dient direkt als Matrize für die Translation des Polyproteins und die Replikation. Nach Lokalisation des Polyproteins am ER erfolgt die co- und post-translationale Modifikation. Die funktionsfähigen Proteine sind dann an der Reifung der Virionen beteiligt, die anschließend über den sekretorischen Weg aus der Zelle sezerniert werden ^[87].

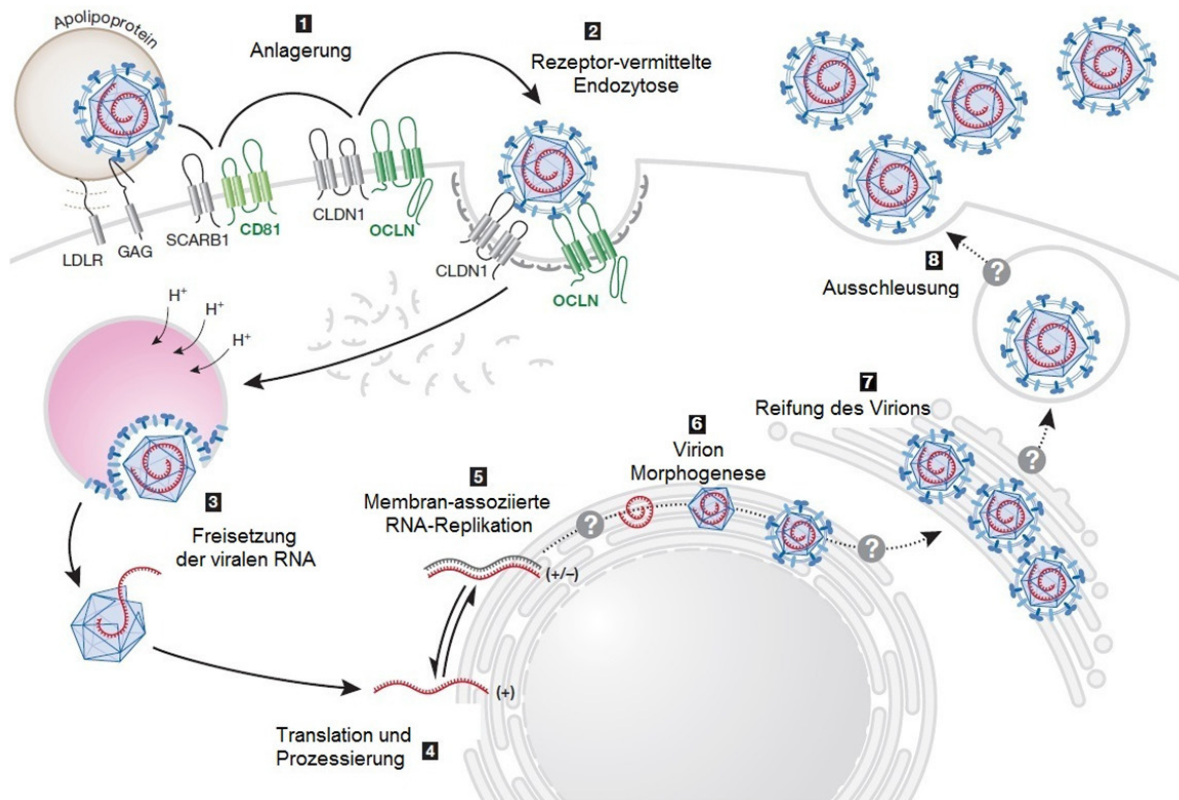


Abbildung 1.5: Infektionszyklus von HCV. HCV heftet an Oberflächenproteine der Wirtszelle und kann anschließend über die Interaktion mit bestimmten Rezeptoren (z.B. CD81) als Virus-Rezeptor-Komplex zum Ort der Endozytose transloziert werden [1, 2]. Nach Azidifizierung des Endosoms kommt es zur Freilassung der viralen RNA ins Zytoplasma [3]. Durch Translation des Polyproteins und anschließende Prozessierung [4] stehen funktionsfähige virale Proteine zur Verfügung, welche, zusammen mit der replizierten RNA, bei der Virionenbildung beteiligt sind [5, 6, 7]. Die reifen Viruspartikel verlassen die Zelle dann über den sekretorischen Weg. Modifiziert nach ^[87].

1.1.3.1 Rezeptor-Bindung und Eintritt in die Wirtszelle

Der erste Schritt bei der HCV-Infektion ist die Bindung der Viruspartikel an bestimmte Bindungsproteine und Rezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszelle (Abbildung 1.5). Aufgrund der Assoziation der Virionen mit Lipoprotein-Partikeln (LDL, VLDL) ist die nachgewiesene Bindung an den *low-density* Lipoprotein-Rezeptor (LDL-R) nicht überraschend ^[88; 89]. Zudem konnte eine Bindung an Glykosaminoglykane (GAG) ^[90] nachgewiesen werden. Nach dieser initialen Bindung können die Viruspartikel mit weiteren Rezeptoren interagieren, was eine Rezeptor-vermittelten Endozytose induziert. Darunter

gehören u.a. der CD81-Rezeptor sowie der *Scavenger* Rezeptor Klasse B Typ I (SR-BI) ^[91]. CD81, ein Mitglied der Familie der Tetraspanin-Protein-Familie, interagiert mit dem viralen Oberflächenprotein E2 und ist der bisher am besten untersuchte Rezeptor beim Eintrittsprozess von HCV in die Wirtszelle ^[92]. SR-BI hingegen interagiert mit LDL/HDL (*high-density lipoprotein*) und E2 ^[93; 94], wobei noch unklar ist, ob die Interaktion dieses Rezeptors mit HCV direkt oder durch HCV-assoziierte Lipoproteine vermittelt wird. Sowohl CD81 als auch SR-BI können durch ihr Expressionslevel in von HuH-7-stammenden Zelllinien die HCV-Infektion regulieren ^[95–97]. Darüber hinaus zeigen weitere Untersuchungen, dass Claudin-1 (CLDN-1) und Occludin (OCLN), Zell-Zell-Verbindungsproteine (*tight junction proteins*), als Co-Rezeptoren beim Eintritt von HCV beteiligt sind ^[98]. Über Clathrin-vermittelte Endozytose ^[99] erfolgt letztendlich die Einschleusung des Viruspartikels ins Zytoplasma der Zelle. Durch das Ansäuern des endosomalen Kompartiments kommt es zu strukturellen Veränderungen der Oberflächenproteine E1 und E2, die als Fusionsproteine die endosomale und die virale Membran miteinander verschmelzen ^[60; 100] und zur Entlassung der genomischen HCV-RNA ins Zytosol beitragen (Abbildung 1.5).

1.1.3.2 Translation und Replikation der HCV-RNA

Nach der Freisetzung der viralen (+) ss RNA kann diese aufgrund ihrer Positivstrang-Orientierung direkt vom zellulären Syntheseapparat in das Polyprotein translatiert werden. Dies geschieht über Cap-unabhängige, IRES-vermittelte Synthese (Kapitel 1.2.2). Die Translation erfolgt dabei am ER, an dem auch die Prozessierung der reifen viralen Proteine stattfindet. Die voll funktionsfähigen Nicht-Strukturproteine bleiben anschließend in der ER-Membran verankert oder an sie assoziiert ^[58]. Das Protein NS4B induziert anschließend Einstülpungen der ER-Membran ^[101]. Diese veränderten Membranen werden auch als *membranous web* bezeichnet ^[72] und bilden den Ort der HCV-Replikation ^[73]. Die Amplifikation der viralen RNA erfolgt über die RdRp NS5B, das Schlüsselenzym des Replikationskomplexes (*replication complex*, RC). Die anderen Komponenten des RC sind die Proteine NS3-4A, NS4B, NS5A/B und die virale RNA (Abbildung 1.6). Es wird angenommen, dass die viralen Bestandteile des RC vor Abbau durch Proteinasen und Nukleasen geschützt werden, wobei Nukleotide zum Ort der Replikation passieren können ^[102]. Die RdRp NS5B synthetisiert *de novo* direkt von der genomischen RNA über Minusstrang (-) RNA-Intermediate weitere (+) ss RNA-Kopien ^[37]. Dabei wird angenommen, dass die (-) und (+) ss RNA-Stränge miteinander hybridisieren (Abbildung 1.5) und so als Matrize für die semikonservative Replikation zur Synthese neuer genomischer RNA dienen ^[19]. Die neuen Positivstrang-RNA-Kopien werden anschließend in neue infektiöse Viruspartikel verpackt (Abbildung 1.6).

1.1.3.3 Bildung reifer Viruspartikel und Austritt aus der Zelle

Der Prozess des Zusammenbaus und der Ausschleusung von HC-Virionen aus Hepatozyten ist noch nicht komplett untersucht. Bekannt ist, dass Core mit der 5'-UTR des HCV-Genoms interagiert und somit vermutlich die Partikelproduktion initiiert ^[56; 103]. Core bindet in der Zelle an LDs ^[104; 105]. Diese Organellen dienen der Aufbewahrung von Lipiden und sind umgeben von einer Phospholipid-Grenzschicht der äußersten ER-Membran. Die Core-gebundenen LDs werden zusammen mit apoE zum Ort der Knospung navigiert (Abbildung 1.6) und spielen demnach eine große Rolle beim Zusammenbau der Partikel ^[55]. Die Interaktion von Core mit NS2 und NS3-4A ist dabei entscheidend ^[106].

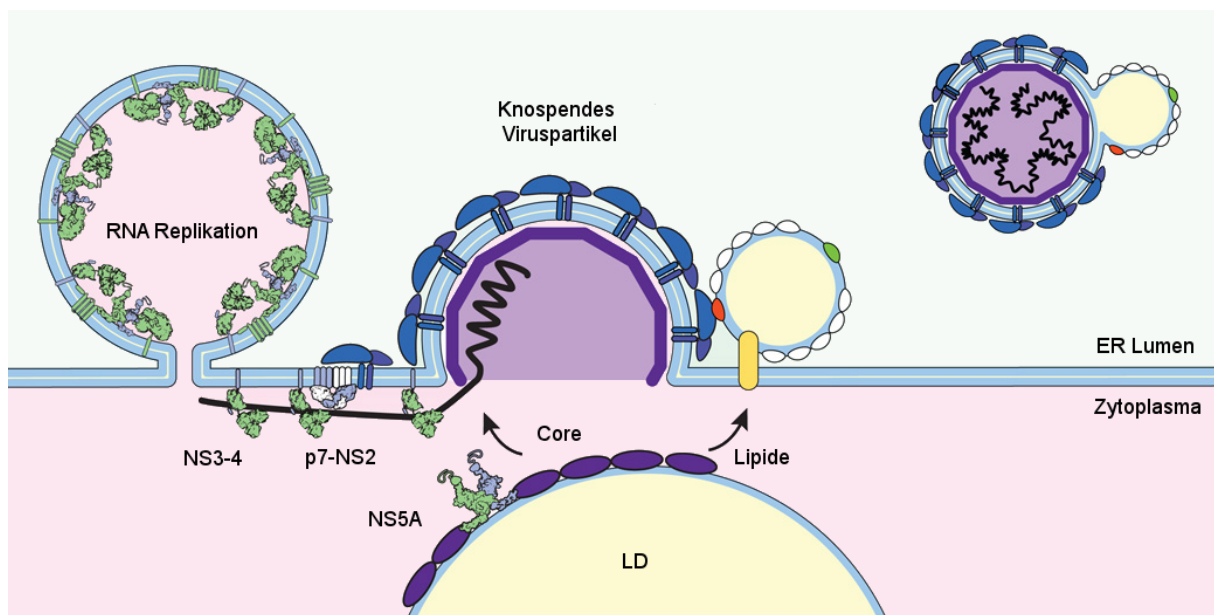


Abbildung 1.6: Modell des Zusammenbaus eines HCV-Partikels. Das Core-gebundene lipid droplet (LD) wird zum Ort der Knospung an die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) gebracht. Dort interagieren die viralen Proteine p7-NS2, NS3-4A, NS5A und Core zusammen mit Lipoproteinen zum Ziel der Partikelbildung. Die Replikation der viralen RNA hängt dabei über bestimmte virale Proteine eng mit der Knospung zusammen. Verändert nach ^[107].

NS2 bringt den E1-E2-Komplex, p7 und NS3-4A innerhalb der ER-Membran zusammen. Die Komplexe p7-NS2 und NS3-4A koordinieren über Protein-Protein-Interaktion den Zusammenbau der Partikel und rekrutieren u.a. die Core-enthaltenden LDs. ^[64–66]

Über die schwache Bindung von p7-NS2 an das NS5A-Protein ^[64; 66] interagiert dieses mit Core an den LDs ^[56; 57; 78], aber auch mit apoE, welches ebenfalls für die Bildung der Viruspartikel gebraucht wird ^[106; 108]. Mutationsstudien im NS5A zeigen eine Steigerung der RNA-Replikation mit einer gleichzeitigen Reduktion der Partikelproduktion. Dies lässt vermuten, dass NS5A am Umschalten von RNA-Replikation zu Virusproduktion beteiligt ist.

Die enge Koordination von Partikelformation zur RNA-Replikation konnte bereits für andere Viren der Familie gezeigt werden ^[101].

Das NS3 besitzt eine RNA-Helikase-Aktivität die nahe legt, dass NS3-4A beim Verpacken der RNA beteiligt ist. Dabei ist die Bindung von Core an die NS3-Helikase-Domäne essentiell ^[109]. Allerdings ist noch unbekannt, ob NS3 direkt an der Nukleokapsid-Bildung involviert ist. Es wird von der gleichzeitigen Virionbildung mit der Knospung ins ER-Lumen ausgegangen (Abbildung 1.6). Dieser Prozess wird durch die Interaktion von Core mit dem in der ER-Membran verankerten E1-Protein induziert ^[110].

Die reifen Viruspartikel werden anschließend über den sekretorischen Weg aus der Zelle entlassen ^[61]. In diesem Abschnitt der HCV-Infektion spielt das Viroporin p7 ebenfalls eine entscheidende Rolle: es neutralisiert die sauren Kompartimente innerhalb der Transportkette und stabilisiert so indirekt die Partikel bis zur Entlassung ^[111]. Zudem kommt es während des Entlassungsprozesses zur post-synthetischen Lipidation der Viruspartikel, ähnlich der VLDL-Reifung ^[110].

Über die Produktion infektiöser Viruspartikel hinaus kann es zudem zur direkten Infektion benachbarter Zellen kommen, wobei die genauen Mechanismen dieser Infektion noch ungeklärt sind ^[112; 113].

1.2 Molekulare Mechanismen der Translationsinitiation

Die Translation einer eukaryotischen mRNA erfolgt in drei Phasen: Initiation, Elongation und Termination. Die Initiation der Translation erfolgt über die Bindung zellulärer Faktoren an die mRNA. Die mRNA weist an ihrem 5'-Ende ein 7-Methylguanosin als sogenanntes Cap-Nukleotid (m^7G) auf, welches über eine kovalente 5'-5'-Triphosphat-Bindung am ersten Nukleotid befestigt ist. Durch Rekrutierung bestimmter Initiationsfaktoren und letztendlich die Bindung der 40S ribosomalen Untereinheit an die 5'-Region der mRNA ist das Cap das tragende Element der eukaryotischen Translationsinitiation. Darüber hinaus trägt das 7-Methylguanosin, durch Schutz vor zellulären Phosphatasen und Nukleasen, zur Stabilität der mRNA bei ^[114].

Der ORF einer eukaryotischen mRNA ist von einer relativ kurzen 5'-UTR aus 50–100 nt und einer 3'-UTR flankiert. Die 5'-UTR enthält dabei das für die Initiation wichtige Start-Kodon (AUG), während die 3'-UTR von einer aus Adenin-Nukleotiden (poly(A)) bestehenden Sequenz von etwa 50–200 Basen fortgesetzt wird. Dieser Bereich trägt zur Translationseffizienz und Stabilität der mRNA bei ^[115; 116].

Im Vergleich zur klassischen Initiation der Translation existiert noch ein Mechanismus ohne die Verwendung eines Cap-Nukleotids: die Cap-unabhängige oder auch IRES-abhängige Translation. Die IRES-Sequenz wurde erstmals 1988 in Poliovirus- und

Encephalomyocarditis-Virus-RNA entdeckt [117; 118] und kommt in der 5'-UTR von Positivstrang-RNA-Viren wie HCV vor. Es gibt bei den *Picornaviridae* und *Flaviviridae* insgesamt vier Typen von IRES-Strukturen, von denen drei den *Picornaviridae* zugeordnet werden können, während die vierte Klasse durch HCV und Pestiviren repräsentiert wird (Abbildung 1.7).

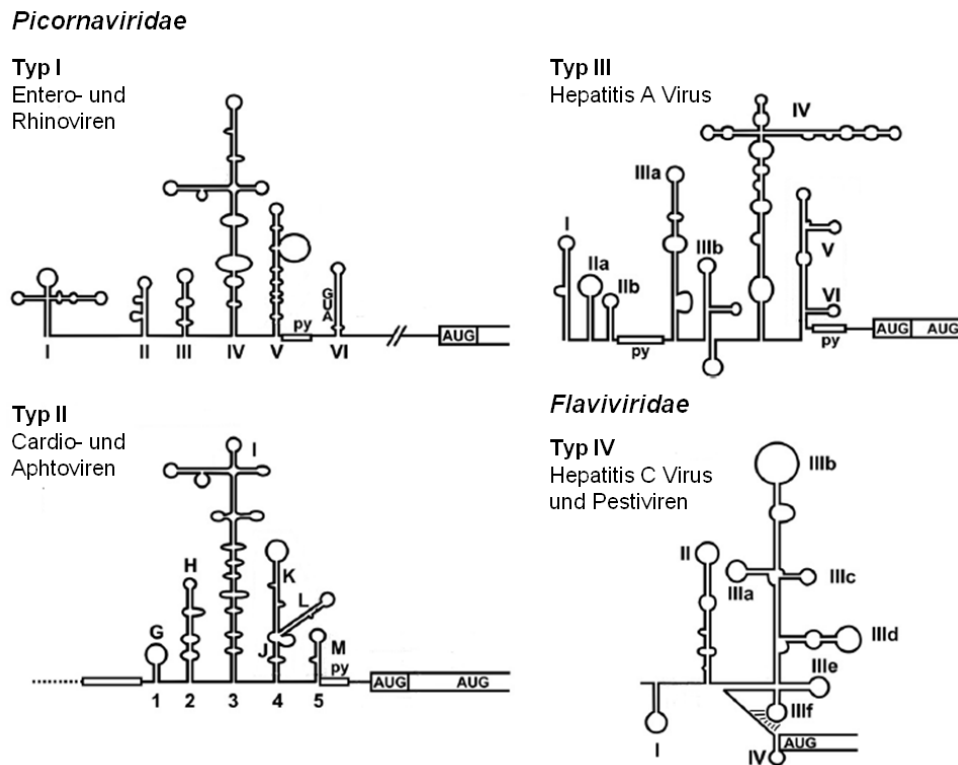


Abbildung 1.7: Die vier Typen klassischer IRES-Strukturen. Schematische Darstellung der vier verschiedenen IRES-Klassen, repräsentiert durch Entero- und Rhinoviren (Typ I), Cardio- und Aphtoviren (Typ II), Hepatitis A Virus (HAV; Typ III) und HCV und Pestiviren (Typ IV). Die ersten drei Klassen werden von Mitgliedern der *Picornaviridae* vertreten, letztere beinhaltet Mitglieder der *Flaviviridae*. Die Haarnadelstrukturen sind entweder durch römische (Typ I, III und IV) oder arabische Zahlen (Typ II) nummeriert. py: Polypyrimidin-Bereich. Modifiziert nach [119].

Mittlerweile sind auch IRES-Sequenzen in zahlreichen mRNAs nachgewiesen worden, um einer Reduktion der Translation bestimmter Proteine bei zellulärem Stress zu umgehen [120; 121]. Bei HCV befindet sich die IRES ebenfalls in der 5'-UTR, von der Haarnadelstruktur II bis IV (SLII bis SLIV) und einem Teil der Core-kodierenden Region im ORF. Der Mechanismus unterscheidet sich sehr von dem der Cap-abhängigen Translation und wird im Folgenden näher erläutert.

Die letzten beiden Phasen der Translation verlaufen in beiden Fällen dagegen gleich ab.

1.2.1 Cap-abhängige Initiation der Translation

Die Initiationsphase der Translation ist ein komplexer Prozess, der letztendlich durch Mitwirkung eukaryotischer Initiationsfaktoren (eIFs) zur Bildung des ribosomalen 80S-Komplexes am Start-Kodon der mRNA führt (Abbildung 1.8). Im ersten Schritt erfolgt die Bindung der 40S ribosomalen Untereinheit, stabilisiert über die Bindung an eIF3, an die Methionin-tragende Start-tRNA (Met-tRNA_i)^[122; 123]. Die Met-tRNA_i ist in einem Komplex aus GTP-gebundenem eIF2 (eIF2-GTP) verankert und bildet zusammen mit eIF1, eIF1A und der 40S-Untereinheit den 43S-prä-Initiationskomplex. eIF4E bindet als Bestandteil des heterotrimeren eIF4F-Komplexes aus eIF4E, eIF4G und eIF4A an das Cap-Nukleotid der 5'-UTR^[124]. Die Interaktion des Adapterproteins eIF4G mit eIF3 führt dann zur Rekrutierung der mRNA an den 43S-prä-Initiationskomplex^[125]. eIF4G interagiert zudem mit dem am 3'-Ende der mRNA gebundenen poly(A)-Bindeprotein (PABP). Dies führt zu einer Zirkularisierung der mRNA^[126], die möglicherweise der Kontrolle der RNA-Integrität dient und eine zyklische Ribosomenbindung gewährleistet.

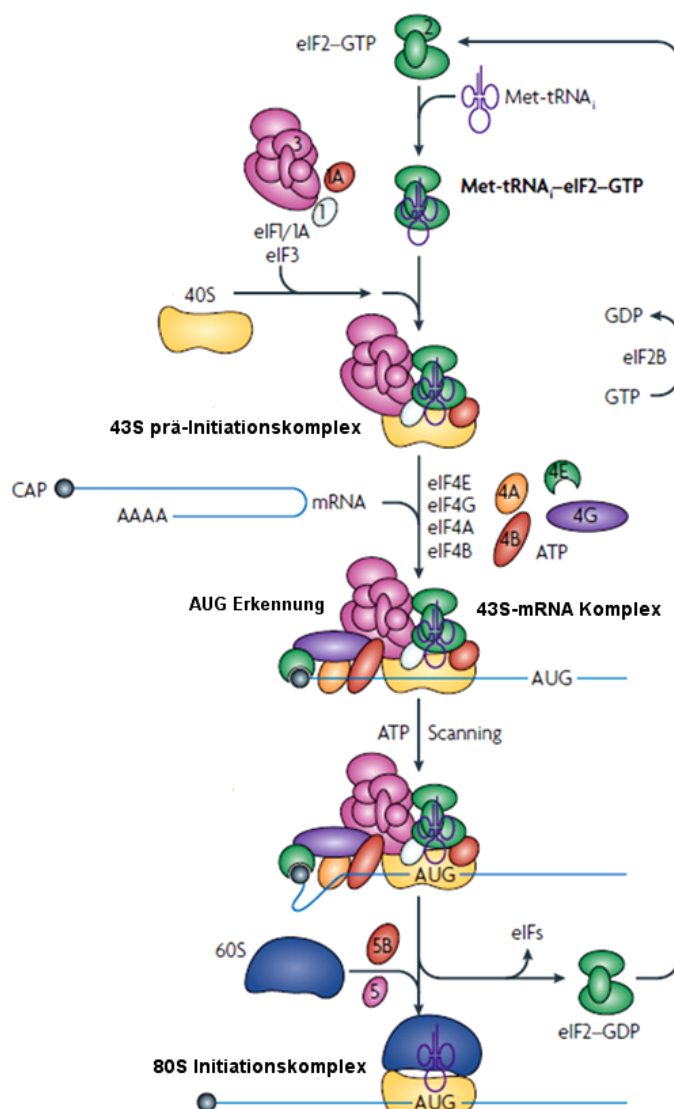


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der Cap-abhängigen Translationsinitiation.

Einzelne Schritte der Bindung der eukaryotischen Initiationsfaktoren (eIFs) an eine mRNA in Abhängigkeit eines Cap-Nukleotids während der Initiation der Translation. Zunächst binden eIF4-Untereinheiten an die Cap-Struktur am 5'-Ende der mRNA. Anschließend erfolgt die Rekrutierung des 43S-prä-Initiationskomplexes, wodurch die Suche (*Scanning*) nach dem Start-Kodon (AUG) der Translation initiiert wird. Sobald das Kodon gefunden wurde, verlassen die eIFs die mRNA und ermöglichen so die Bindung der 60S-Untereinheit zur Bildung eines 80S-Initiationskomplexes. Verändert nach^[127].

Die anschließende Suche (*Scanning*) des prä-Initiationskomplexes nach dem AUG-Start-Kodon beginnt und erfolgt mit Hilfe der RNA-abhängigen ATPase-Aktivität von eIF4A ^[128]. Die 5'-UTR der mRNA wird dabei durch eIF4A und die Co-Faktoren eIF4B und eIF4H linearisiert ^[129]. Die Bestimmung des korrekten Start-Kodons über eIF1 und eIF1A ^[130] und die anschließende Paarung des anti-Kodons der Met-tRNA_i mit dem AUG-Basentriplett führt zur Hydrolyse des GTPs durch eIF2 unter Mitwirkung des GTPase-aktivierenden Proteins eIF5 (Abbildung 1.8). Es kommt zur Dissoziation des eIF2-GDP-Komplexes von der 40S ribosomalen Untereinheit. eIF2 wird dann von eIF2B, dem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor, wieder recycelt.

Die eIFs verlassen die mRNA und erlauben somit die Bindung der 60S ribosomalen Untereinheit an die 40S-Untereinheit. Es kommt zur Bildung des 80S-Initiationskomplexes, katalysiert durch eIF5 ^[131; 132].

1.2.2 HCV-IRES-abhängige Initiation der Translation

Bei der Translationsinitiation von HCV bindet die kleine 40S ribosomale Untereinheit, im Gegensatz zur Cap-abhängigen Translation, in Abwesenheit jeglicher Initiationsfaktoren an die IRES (Abbildung 1.9). Die Domänen SLII, SLIIla, d, e und f sowie SLIV sind an der Bindung der 40S-Untereinheit an die IRES beteiligt ^[130; 133; 134], wobei die *pseudoknot*-Region eine essentielle Rolle spielt ^[29; 135]. Die IRES-Region ersetzt die beim Aufsuchen der Initiationsstelle beteiligten eIF4-Untereinheiten der Cap-abhängigen Translation, durch die direkte Bindung der kleinen ribosomalen Untereinheit an das Start-Kodon ^[130]. Es kommt zur Konformationsänderung der 40S-Untereinheit, verursacht durch SLII ^[136]. Die Bindung des zellulären Initiationsfaktors eIF3 und des ternären Komplexes eIF2-GTP-Met-tRNA_i wird durch die Strukturen SLIIlb und c induziert ^[134; 137]. eIF3 verstärkt dabei die Bindung der 40S ribosomalen Untereinheit an die HCV-IRES und begünstigt so die Bildung des 80S-Initiationskomplexes ^[127; 130]. Die IRES-Domänen SLII, SLIIla und der Knotenpunkt von SLIIlabcd sind an der Komplexbildung beteiligt ^[33; 34; 137]. Dabei hilft eIF5 bei der Erkennung des AUG-Basentriplets durch den ternären Komplex und stimuliert anschließend die GTP-Hydrolyse ^[130]. Es erfolgt die Bindung der 60S-Untereinheit an die HCV-IRES, wodurch eIF2 und eIF5 die RNA verlassen und eIF3 am Ribosomen assoziiert bleibt ^[138].

Es konnte gezeigt werden, dass unter bestimmten Bedingungen, wie zellulärer Stress, eIF2 durch andere Faktoren, wie eIF5B ^[139], eIF2D ^[140] oder eIF2A ^[141], bei der Lieferung der Met-tRNA_i an den ribosomalen Komplex ausgetauscht werden kann.

Wie bei der Cap-abhängigen Translation wird auch die IRES-vermittelte Initiation der Proteinsynthese durch die Mitwirkung der 3'-UTR stimuliert ^[44; 142]. Auch hier wird eine Zirkularisierung vermutet, sodass eine Kontrolle der Integrität der 3'-UTR zur Produktion nur

voll funktionsfähiger Proteine und damit infektiöser Viruspartikel führt ^[143]. Die Beteiligung bestimmter zellulärer Faktoren und der verwendete Mechanismus sind noch ungeklärt.

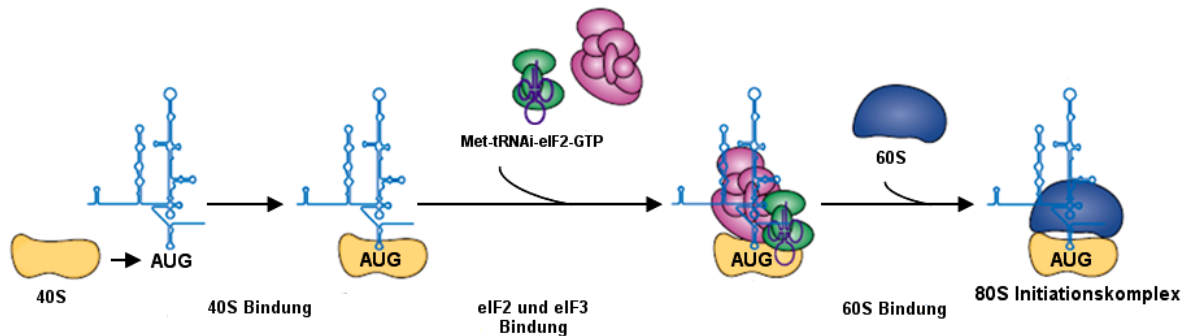


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der IRES-abhängigen Translationsinitiation von HCV. Einzelne Schritte der Bindung der zellulären Faktoren an die HCV-5'-UTR in Abhängigkeit einer IRES-Struktur zur Initiation der Translation. Die 40S ribosomale Untereinheit bindet direkt an das Start-Kodon von SLIV, wodurch ein Komplex aus eIF3, eIF2 und der Start-tRNA (Met-tRNA_i) rekrutiert wird. Es kommt zur Hydrolyse des gebundenen GTPs durch eIF5, was zur Bindung der 60S ribosomalen Untereinheit führt. Verändert nach ^[127].

1.2.3 IRES *trans-acting factors* (ITAFs) und ihre Funktionen

Im Vergleich zur Cap-abhängigen Translation sind bei der IRES-vermittelten Initiation der Proteinsynthese von HCV nur insgesamt drei eIF-Gruppen beteiligt. Zur Unterstützung der Effizienz der internen Translationsinitiation werden zusätzlich sogenannte IRES *trans-acting factors* (ITAFs) rekrutiert. Diese Proteine sind normalerweise am zellulären RNA-Metabolismus beteiligt, jedoch nicht bei der Cap-abhängigen Translation involviert. Für HCV konnten bereits einige ITAFs identifiziert werden: das La-Protein, NS1-assoziiertes Protein (NSAP1), heterogenes nukleares Ribonukleoprotein (hnRNP) L und D, *Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1* (IMP-1), Gem-assoziiertes Protein 5 (Gemin5), Sm-ähnliche Proteine (LSm1-7), *Polypyrimidine tract-binding protein* (PTB) und poly(C)-bindendes Protein 2 (PCBP2). Ihre strukturellen Eigenschaften und ihre Effekte auf die HCV-Translation sind in Abbildung 1.10 aufgeführt. Die meisten der ITAFs tragen mehrere RNA-Bindungsdomänen, die eine Bindung an die virale RNA ermöglichen. Die am häufigsten vorkommenden Domänen sind das RNA-Erkennungsmotiv (*RNA recognition motif*, RRM) ^[144] und die hnRNP K homologe Domäne (KH) ^[145]. Vergleichsweise selten, aber für das La-Protein charakterisierend, ist das La-Motiv ^[146].

Der Effekt auf die HCV-Translation ist sehr unterschiedlich und kann je nach ITAF stimulierend oder reduzierend sein (Abbildung 1.10). Die Proteine La, hnRNP L und NSAP1 binden an Protein-kodierende Regionen der HCV-RNA ^[147–149]. Dagegen interagiert hnRNP D mit SLII der HCV-IRES ^[150] und ist zusammen mit den anderen Proteinen an einer Steigerung der Effizienz der Translation beteiligt. Darüber hinaus ist bekannt, dass einige

ITAFs miteinander interagieren, z.B. hnRNP D mit L^[151] oder La-Protein mit LSm1-7^[152], und vermutlich zusammen bei der Regulation der Translation beteiligt sind. Der molekulare Mechanismus dahinter ist jedoch noch ungeklärt.

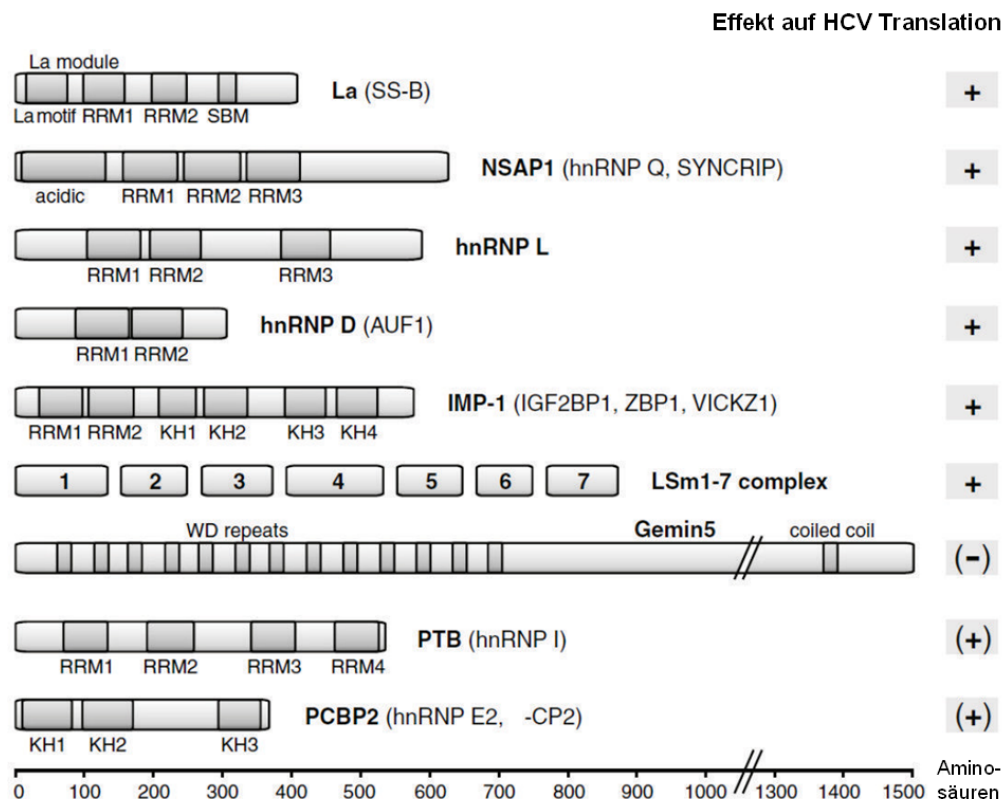


Abbildung 1.10: Schematische Darstellung der HCV-IRES *trans-acting factors* (ITAFs). Gezeigt sind die verschiedenen ITAFs der HCV-IRES mit ihren Bindungsdomänen (dunkel-grau) wie dem RNA-Erkennungsmotiv (*RNA recognition motif*, RRM), der sauren Domäne (*acidic*), der KH- (hnRNP K homologe) oder der La-Domäne. Die Proteine sind: La-Protein, NS1-assoziiertes Protein (NSAP1), heterogenes nukleares Ribonukleoprotein (hnRNP) L und D, *Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1* (IMP-1), Gem-assoziiertes Protein 5 (Gemin5), Sm-ähnliche Proteine (LSm1-7), *Polypyrimidine tract-binding protein* (PTB) und poly(C)-bindendes Protein 2 (PCBP2). Der Effekt auf die HCV-Translation ist dabei entweder stimulierend (+) oder reduzierend (-). Verändert nach^[51].

Über die ITAFs hinaus konnten noch weitere zelluläre Faktoren identifiziert werden, die eine Stimulation der Proteinbiosynthese induzieren, wie die microRNA-122 (miR-122) oder das damit verbundene Argonaute- (Ago-) Protein^[153–155]. Im Gegensatz zu den ubiquitär exprimierten ITAFs könnte die leberspezifische miR-122 für den Lebertropismus von HCV verantwortlich sein.

1.3 microRNAs

microRNAs (miRNAs) sind eine Klasse von nicht-kodierenden, einzelsträngigen RNAs, die post-transkriptional bei der Regulation der Genexpression eine entscheidende Rolle

spielen ^[156]. Die etwa 22 nt langen miRNAs binden als miRNA-Protein-Komplexe (miRNP-Komplexe) an komplementäre Sequenzen hauptsächlich in der 3'-UTR von mRNAs ^[157]. Je nach Bindungsart kommt es zur Degradierung der Ziel-RNA, einer Reduktion der Proteinbiosynthese oder Destabilisierung der mRNA durch Verkürzung des poly(A)-Bereichs ^[158]. Diese nicht-kodierenden RNAs werden in verschiedenen Zelltypen und Geweben exprimiert und sind an zahlreichen biologischen Prozessen beteiligt, wie an der Zellreifung ^[159], an der Tumor-Suppression ^[160], oder aber an der Regulation des Lipidmetabolismus ^[161]. Dies ist nicht ungewöhnlich, wenn man bedenkt, dass jede miRNA eine große Anzahl von mRNAs adressieren kann.

Darüber hinaus ist bekannt, dass auch Viren wie HCV mit zellulären miRNAs interagieren ^[153; 155; 162; 163] oder sogar eine microRNA auf ihrem Genom kodieren ^[164] und dadurch die Virus-Wirt-Interaktion beeinflussen.

1.3.1 Biogenese und Funktion von miRNAs

Die genomische Organisation der miRNAs ist sehr verschieden: etwa 40 % sind in Introns von nicht-kodierenden oder Protein-kodierenden Bereichen lokalisiert, während nur etwa 10 % in Exons zu finden sind. Einige miRNAs haben einen unbestimmten Ursprung und der Rest stammt von repetitiven Sequenzen ab ^[165].

Die miRNA-Gene werden von der RNA-Polymerase II im Nukleus zu sehr langen, mit Cap-Nukleotid versehenen und polyadenylierten, primären Transkripten (pri-microRNAs) synthetisiert (Abbildung 1.11) ^[46]. Diese werden nachfolgend von einem Komplex, bestehend aus der RNase III Drosha und dem RNA-Bindeprotein DGRC8, zu 70 nt langen Vorläufermolekülen (pre-microRNA) prozessiert ^[166]. Die pre-microRNAs bestehen aus einer Haarnadelstruktur mit einem 5'-Phosphat und zwei Nukleotiden als Überhang am 3'-Ende der Sequenz ^[167]. Dieser Überhang wird von Exportin-5, einem Mitglied der Karyopherine, erkannt und dient somit als Export-Signal für die pre-microRNA ins Zytoplasma. Der Energie-abhängige Transport findet über die Bindung von Ran-GTP an Exportin-5 und die anschließende Hydrolyse zu Ran-GDP im Zytoplasma statt ^[168]. Dort kommt es nach der Freilassung der RNA zur vollständigen Reifung der miRNA-Moleküle über den zweiten Komplex aus RNase III und RNA-Bindeprotein: Dicer/TRBP ^[169]. Die 22 nt langen, imperfekten miRNA-Duplexe werden in den Führungsstrang (*guide strand*) und den Gegenstrang (*passanger strand*) unterteilt ^[170]. Der Strang mit der schwächeren Basenpaarung am instabileren 5'-Ende des Duplex wird zum Führungsstrang ^[171; 172]. Beide RNA-Moleküle werden nachfolgend in einem Komplex aus Dicer/TRBP und von TRBP rekrutierten Ago-Proteinen ^[169] entwunden, wobei der Gegenstrang degradiert und der Führungsstrang integriert wird ^[172]. Der daraus resultierende *RNA-induced silencing complex*

(RISC) dient anschließend der Interaktion der miRNA mit der Ziel-Nukleinsäure, wobei die Interaktion von miRNA und Ago der dabei entscheidende Faktor ist. Für die Funktionalität des RISC sind noch weitere Proteine von Bedeutung, wie z.B. das PACT oder TNRC6B ^[173; 174].

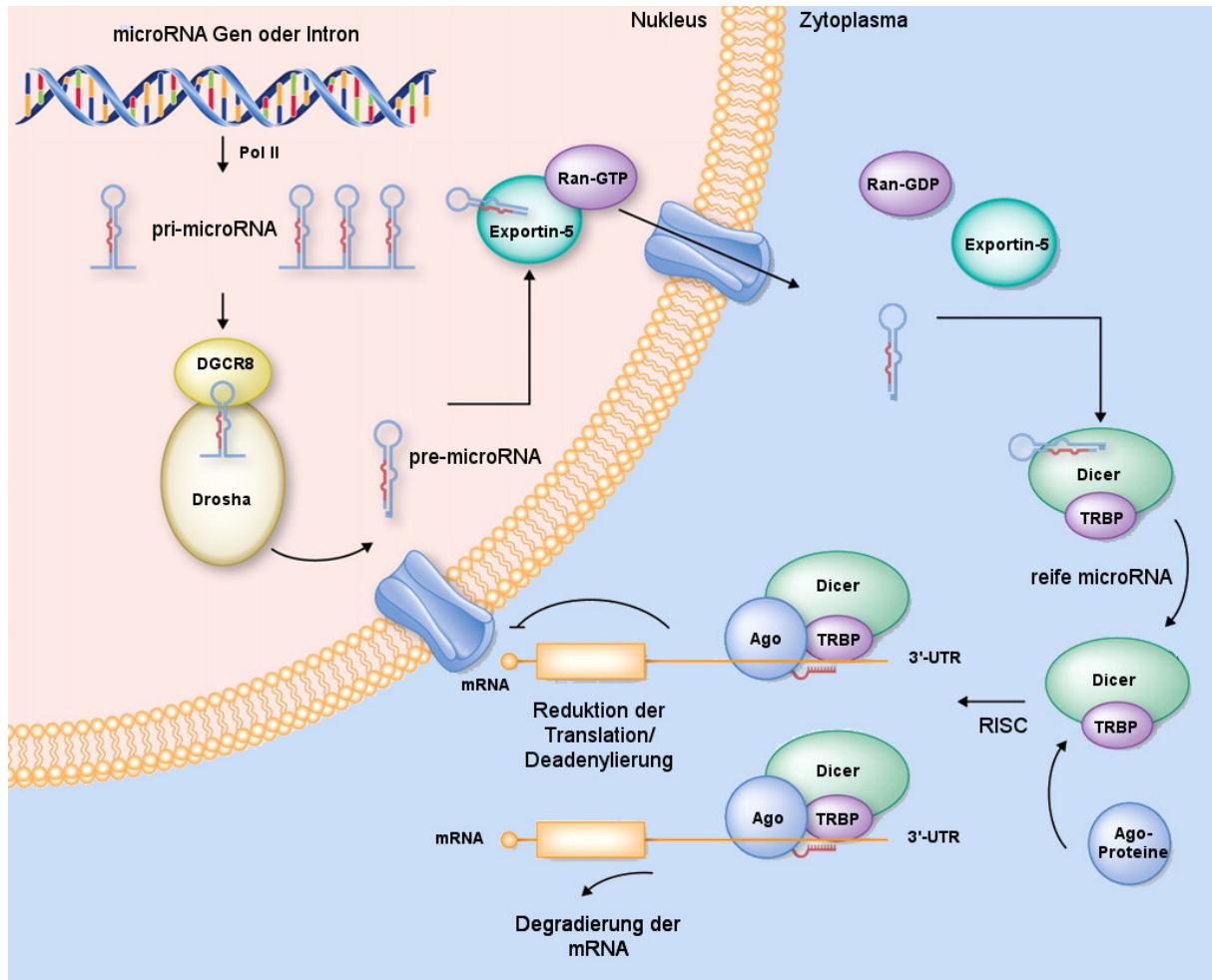


Abbildung 1.11: Biogenese und Funktion zellulärer microRNAs. microRNAs werden im Zellkern von der RNA Polymerase (Pol) II in 80 nt lange primäre microRNAs transkribiert (pri-microRNA). Die Haarnadelstruktur der pri-microRNA wird durch die Endonuklease Drosha im Komplex mit dem Co-Faktor DGCR8 erkannt und zur pre-microRNA prozessiert. Diese wird anschließend über Exportin-5/Ran-GTP ins Zytoplasma transportiert. Nach Bindung der pre-microRNA an den Dicer/TRBP Komplex erfolgt die Reifung zu doppelsträngigen miRNAs. Der miRNA-Duplex wird entwunden. Der resultierende einzelsträngige miRNA-Führungsstrang bildet, zusammen mit Argonaute- (Ago-) Proteinen, den *RNA-induced silencing complex* (RISC) und bindet so an die 3'-UTR ihrer Ziel-mRNA. Die Expression der Ziel-mRNAs wird über die Bindungseffizienz der miRNAs unterschiedlich beeinflusst und führt entweder zur Degradierung der mRNA oder zur Reduktion der Translation. Verändert nach ^[175].

Ago-Proteine sind essentielle katalytische Komponenten des RISC und binden neben miRNAs noch weitere kleine, nicht-kodierende RNAs, wie *small interfering RNAs* (siRNAs) oder *Piwi-interacting RNAs* (piRNAs).

Die Proteine der Ago-Familie sind aus vier charakteristischen Domänen aufgebaut: der N-terminalen Domäne, PAZ, MID und PIWI (Abbildung 1.12). Die PAZ-Domäne dient der

Bindung des 3'-Endes des miRNA-Führungsstrangs, während das 5'-Phosphat von der MID-Domäne gebunden wird. Die PIWI-Domäne hingegen ähnelt strukturell der Ribonuklease H und dient dem Schneiden der Ziel-mRNA ^[176; 177].

Die reife miRNA im RISC führt die Ago-Proteine zur Ziel-RNA über komplementäre Basenpaarung zwischen der 2–8 nt langen *seed*-Sequenz am 5'-Ende der miRNA und dem 3'-Ende der Zielsequenz in der mRNA. Durch strukturelle Änderungen der Ago-Untereinheiten wird das 3'-Ende der miRNA aus der PAZ-Domäne entlassen, wodurch letztendlich die Hybridisierung an die mRNA fortlaufen kann ^[178]. Die Hybridisierung kann sowohl perfekt als auch von nicht-paarenden Bereichen, durch Ausbildung von Wölbungen, unterbrochen sein. Je nachdem kommt es dann zum Abbau der mRNA oder zur Reduktion der Translation (Abbildung 1.11). Die variierende Anzahl an paarenden Nukleotiden der miRNA sowie die unterschiedlichen Ausprägungen bei der Hybridisierung erhöhen die Anzahl möglicher Ziel-mRNAs erheblich ^[179].

Bei einer perfekten Basenpaarung zwischen miRNA und mRNA wird das Transkript direkt von der PIWI-Domäne geschnitten (Abbildung 1.12).

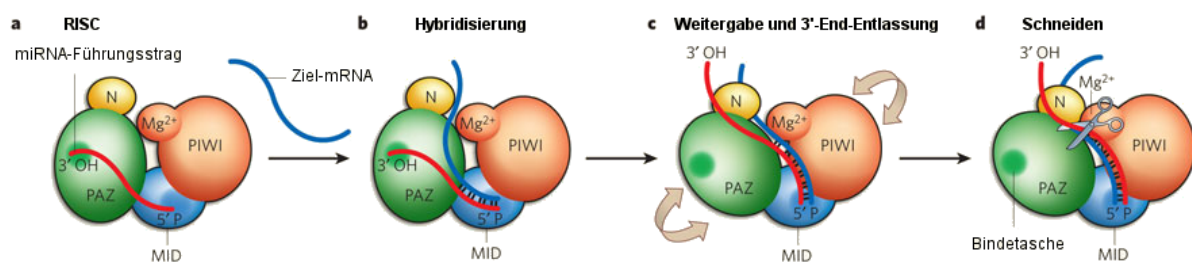


Abbildung 1.12: Schematischer Aufbau des RNA-induced silencing complex. (a) Argonaute- (Ago-) Proteine sind aus vier Domänen aufgebaut: der N-terminalen Domäne N (gelb), PAZ (grün), MID (blau) und PIWI (orange). Zusammen mit einer kleinen, nicht-kodierenden miRNA (rot) bildet Ago den *RNA-induced silencing complex* (RISC) zur Regulation der post-transkriptionalen Genexpression. Der Führungsstrang der Nukleinsäure ist über sein 5'-Phosphat in der MID-Domäne verankert, während das 3'-Ende (3'-OH) von der PAZ-Domäne gebunden wird. (b) Sobald der RISC an die Ziel-RNA bindet, hybridisiert der Führungsstrang an die Ziel-RNA und bildet eine Doppelhelix aus. (c) Durch eine Konformationsänderung des Ago-Proteins kommt es zur fortlaufenden Bindung. Das 3'-Ende des Führungsstrangs wird aus der PAZ-Domäne entlassen, sodass diese rotieren kann. (d) Diese Strukturänderung führt zur Positionierung der Ziel-RNA-Schnittstelle in der Nähe der PIWI-Domäne. Die mRNA wird anschließend, unter Mitwirkung von Magnesium-Ionen (Mg^{2+}), degradiert. Verändert nach ^[178].

Diese Fähigkeit besitzen jedoch nur manche Ago-Proteine. Von denen bei den human vorkommenden vier Mitgliedern (Ago1–4) ist lediglich das Ago2 dazu in der Lage ^[180]. Die PIWI-Domäne enthält dort die funktionale Aspartat-Aspartat-Histidin-Triade mit einem bivalentem Metall-Ion (Mg^{2+}), welches wichtig für die Katalyse ist ^[178]. Erfolgt die Hybridisierung zwischen miRNA und Ziel-RNA mit Unterbrechungen aus nicht-paarenden Bereichen, führt dies zur Absonderung der mRNA in sogenannte *processing-bodies* (P-

bodies)^[181]. Diese im Zytoplasma befindlichen dynamischen Aggregate spielen eine fundamentale Rolle beim exonukleolytischen Abbau von mRNA oder bei der Aufbewahrung der mRNA bis zur Translation^[182].

1.3.2 Die leberspezifische miR-122

Die miR-122 ist eine fast ausschließlich in Leberzellen exprimierte miRNA, die dort mit 135.000 Kopien bis zu 70 % der gesamten miRNA-Menge ausmacht^[183; 184]. Die miR-122 reguliert zahlreiche, zelluläre Aktivitäten: von der Differenzierung der Hepatozyten, über die Regulation des Lipidmetabolismus^[185] und der Eisen-Homöostase^[186] bis hin zur Bildung von HCC^[187]. Letzteres Phänomen geht mit einer Reduktion der miR-122-Expression einher^[187]. Eine Überexpression dieser miRNA in betroffenen Leberzellen zeigte interessanterweise eine eindeutige Tumor-Suppressor-Funktion^[188]. Auch wenn mit Fortschreiten der Leberkarzinombildung eine weitere Reduktion des miR-122-Gehalts erfolgt^[189], so sind noch weitere Faktoren an der Ausbildung von Leberkrebs verantwortlich^[190]. Hepatitis C gilt dabei als eine der Hauptursachen für chronische Lebererkrankungen und steht in enger Beziehung zu HCC.

1.3.3 Der Einfluss der miR-122 auf den HCV-Infektionszyklus

Durch Sequenzanalysen konnten miR-122-Bindungsstellen im HCV-Genom ausfindig gemacht werden, die eine Bindung der leberspezifischen miR-122 an die HCV-RNA nahe legen^[162; 191]. Es befinden sich zwei Erkennungssequenzen der miR-122 in der 5'-UTR und eine weitere Bindungsstelle in der VR der 3'-UTR (Abbildung 1.13). Die Bindung in der 5'-UTR einer RNA ist für miRNAs normalerweise untypisch, binden sie doch meist in der 3'-UTR der polyadenylierten und mit Cap-Nukleotid versehenen zellulären mRNAs.

Die vor der IRES in der 5'-UTR liegenden Sequenzen sind zwischen SLI und SLII lokalisiert und unterscheiden sich in ihrer zur miR-122-*seed*-Region komplementären Sequenz um nur ein Nukleotid. Die erste Bindungsstelle beinhaltet 7 nt (5'-ACACUCC-3'), die zweite Region eine 6 nt lange Bindungsstelle (5'-CACUCC-3') (Abbildung 1.13). Diese und die sich in der 3'-UTR befindlichen Zielsequenz (5'-ACACUCC-3') sind unter den HCV-Genotypen absolut konserviert. Die Lokalisation der miR-122-komplementären Sequenzen zwischen SLI und SLII in der 5'-UTR und die Konservierung deuten auf eine funktionelle Beteiligung der miR-122 auf den HCV-Replikationszyklus hin. Neben den Oberflächenrezeptoren (Kapitel 1.1.3.1) könnte dabei die hauptsächlich in Leberzellen exprimierte miR-122 ein entscheidender Faktor sein, der zum Lebertropismus von HCV beiträgt.

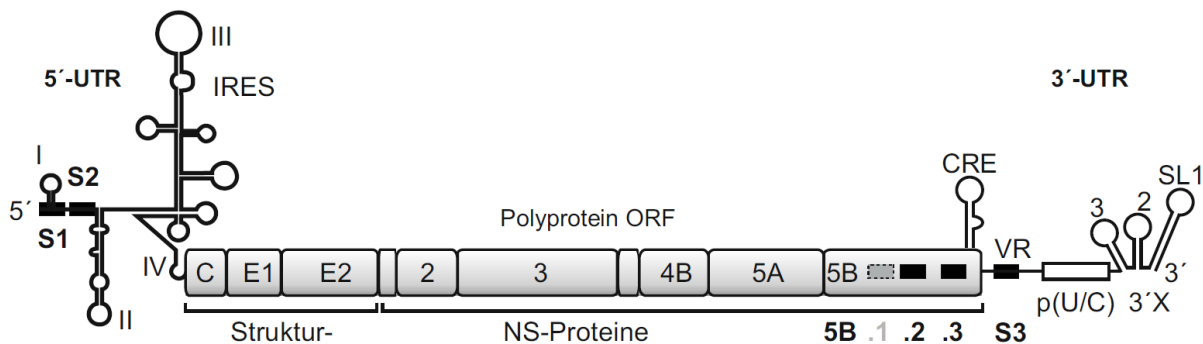


Abbildung 1.13: Darstellung der miR-122-Bindungsstellen im HCV-Genom. Gezeigt sind die Positionen der miR-122-Bindungsstellen (schwarze Kästen) im HCV-Genom, von denen sich insgesamt drei in nicht-kodierenden Bereichen befinden (S1 und S2 in der 5'-UTR, S3 in der VR der 3'-UTR) und weitere drei (5B.1-3) in Protein-kodierenden Abschnitten. Lediglich die erste Zielsequenz der NS5B-kodierenden Sequenz (graues Kästchen) des Polyproteins ist als einzige unter den HCV-Genotypen nicht hoch konserviert (Dissertation N. Dünnes, 2016).

Bereits 2005 konnte von Jopling *et al.* eine direkte Bindung der leberspezifischen miR-122 an die zwei miR-122-Bindungsstellen in der HCV-5'-UTR nachgewiesen werden ^[162]. Eine Sequestrierung der miR-122 in mit HCV-Replikon-transfizierten Zellen führte zu einer Reduktion der Akkumulation der viralen Genome, sodass ein positiver Einfluss der miR-122 auf die Replikation von HCV postuliert wurde. Ein Einfluss auf die Translation konnte jedoch nicht beobachtet werden ^[162; 191].

Eine Stimulation der HCV-Translation durch die physikalische Interaktion der miR-122 mit der 5'-UTR konnte später in der Arbeitsgruppe von M. Niepmann nachgewiesen werden, sogar bei replikationsdefizienten Genomen. Zudem wurde eine Beschleunigung und Unterstützung der Assoziation der kleinen ribosomalen Untereinheit an die IRES der viralen RNA beobachtet ^[153]. Diese und andere Daten zeigen erstmals, dass miRNAs nicht nur an einer Reduktion sondern auch an einer Stimulation der Translation von Ziel-RNAs beteiligt sein können ^[153; 192; 193]. Der Effekt von miR-122 auf die HCV-Translation konnte in weiteren Studien bestätigt werden ^[154; 194–197]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine direkte Bindung von miR-122 an das HCV-Genom essentiell für die Produktion infektiöser Viruspartikel ist, wobei die Adressierung der ersten Zielsequenz (S1) in der 5'-UTR einen deutlich größeren Einfluss hat, als die Bindung der miR-122 an die zweite Bindungsstelle (S2). Allerdings scheint die Beteiligung beider Sequenzen bei der Translation gleichwertig zu sein ^[194]. Auch wenn die miR-122 in mehreren Bereichen des HCV-Replikationszyklus eine Rolle spielt, so wird von Jangra *et al.* der leberspezifischen miRNA eine größere Bedeutung bei der Stabilisierung der RNA sowie RNA-Synthese zugesprochen ^[194]. Ein Einfluss der miR-122 auf die Elongationsphase bei der RNA-Synthese konnte jedoch nicht nachgewiesen werden ^[198]. Allerdings schützt die miRNA die HCV-RNA vor nukleolytischem Abbau ^[199] und steigert die Halbwertszeit replikationsdefizienter HCV-RNA ^[200]. Der miRNP-Komplex dient

dabei, analog zum Cap-Nukleotid, als Schutzkappe vor Degradierung der HCV-RNA, in Abhängigkeit von Ago2 und fördert als solches die Produktion infektiöser Partikel ^[200–203].

Die Beteiligung von Ago2 an den miR-122-induzierten Effekten konnte bereits zuvor in *knock-down* Studien angedeutet ^[154; 195] und in Assoziation mit der miRNA in weiteren Studien nachgewiesen werden ^[155; 204].

Die Bindung der miR-122 an ihre Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR erfolgt nicht nur über die Bindung der *seed*-Sequenz der miRNA an die komplementären Bereiche in der viralen RNA, sondern über die Beteiligung zusätzlicher *seed*-Sequenz-abwärts befindlicher Nukleotide der miR-122. Diese hybridisieren an Bereiche Sequenz-aufwärts der Bindungsstellen in der HCV-RNA (Abbildung 1.14). Von großer Bedeutung sind dabei die Nukleotide 15 und 16 der miR-122 für die Stabilisierung der viralen RNA und für die Genom-Akkumulation ^[199; 201].

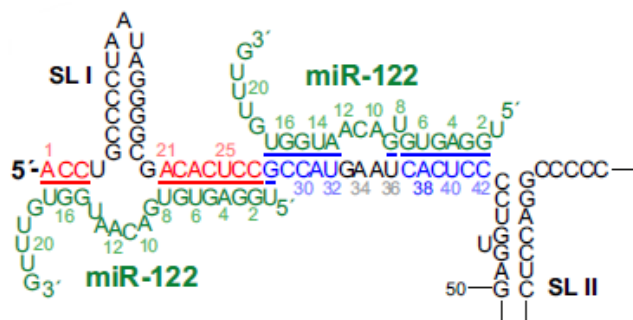


Abbildung 1.14: Bindung der miR-122 an die HCV-5'-UTR. Schematische Darstellung der miR-122-Bindung (grün) an die Zielsequenzen zwischen SLI und SLII in der HCV-5'-UTR (Subtyp 2a). Die imperfekte Bindung erfolgt über die *seed*-Sequenz der miR-122, sowie mit 3–4 weiter 3'-gelegenen Nukleotiden an die erste (rot) und zweite (blau) Bindungsstelle im HCV-Genom.

Diese RNA-Duplexe zeichnen sich durch eine imperfekte Hybridisierung aus, wie sie bei miRNA/mRNA-Bindungen vorkommen können (Kapitel 1.3.1). Interessanterweise induziert diese Interaktion von miR-122 mit der HCV-5'-UTR jedoch eine Stimulation der Translation. Über die bereits bekannten miR-122-Zielsequenzen in den UTRs der HCV-RNA hinaus konnten drei weitere Bindungsstellen in der NS5B-kodierenden Region identifiziert werden (Abbildung 1.13). Lediglich 5B.2 und 5B.3 sind unter den HCV-Isolaten hoch konserviert, die 5B.1-Zielsequenz jedoch nicht. Es konnte bereits eine leichte Reduktion der HCV-Translation durch die Bindung der miR-122 an die 3'-UTR gezeigt werden (Dissertation N. Dünnes, 2016), während die Bindung an 5B.2 die Replikation negativ beeinflusst ^[205].

1.4 Ziele der Arbeit

Die miR-122 hat einen großen positiven Einfluss auf den Infektionszyklus von HCV, indem sie im Komplex mit Ago u.a. an die virale 5'-UTR bindet ^[153; 162]. Der genaue Einfluss dieser Interaktion ist jedoch noch nicht bis ins Detail verstanden. Die miR-122 bindet mit unterschiedlichen Affinitäten an die komplementären Sequenzen ^[194; 206]. Es wird allerdings vermutet, dass beide miRNA-Bindungsstellen simultan durch miR-122 gebunden werden und in gleichem Maße an der Translation beteiligt sind ^[199]. Es konnte bisher jedoch nur nachgewiesen werden, dass die S1 einen höheren Einfluss auf die Produktion infektiöser Viruspartikel hat ^[194], während die miR-122 eine höhere Affinität zur S2 aufweist, wodurch eine stärkere Beteiligung der S2 an der Stabilisierung der HCV-RNA vermutet wird ^[206]. Die Bindung der miR-122 an ihre Erkennungssequenzen in der HCV-5'-UTR scheint, trotz synergistischem Einfluss auf den Replikationszyklus, unterschiedliche Aufgaben zu erfüllen. Zur näheren Untersuchung der individuellen Eigenschaften der miRNA-Bindungsstellen in der 5'-UTR von HCV wurden in der vorliegenden Arbeit die mit der miR-122 hybridisierenden Sequenzen mutiert, um diese anschließend über kompensierende miRNAs separat adressieren und ihre Funktion charakterisieren zu können.

In den verschiedenen experimentellen Ansätzen standen dabei folgende Fragen im Vordergrund:

- I. Bindet die miR-122 an beide komplementäre Sequenzen in gleichem Ausmaß oder wird eine Erkennungssequenz bevorzugt gebunden?
- II. Ist der Effekt der miR-122-Bindung additiv oder kooperativ und wirkt sich diese Art der Bindung ebenso auf die Stimulation der Translation aus?
- III. Wird die HCV-RNA durch die Adressierung einer miRNA-Bindungsstelle besser oder von beiden Sequenzen gleichwertig vor nukleolytischem Abbau geschützt?

Aufgrund der nachgewiesenen direkten Bindung der miR-122 über die Beteiligung von Ago2 im miRNP-Komplex ^[155] wurden die spezifischen Bindungen der artifiziellen miRNAs an die mutierten Sequenzen in der HCV-5'-UTR zunächst über anti-Ago-Protein-co-Immunpräzipitation überprüft und hinsichtlich ihrer Bindungseffizienz charakterisiert. Die Mutationen wurden anschließend in einem monocistronischen Reporter-Konstrukt übernommen und zur Untersuchung der Beteiligung an der Translation verwendet. Aufgrund der schützenden Funktion der miR-122 vor Degradierung durch Nukleasen ^[199; 200] wurde zudem der separate Beitrag der entsprechenden miRNA-Bindungsstelle an der Genom-Stabilität von HCV mithilfe des *RNase Protection Assays* bestimmt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

Stamm	Firma	Genotyp
<i>E.coli</i> DH5α	Invitrogen	F ⁻ , endA1, glnV44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, deoR nupG, purB20, ϕ80dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ ⁻
<i>E.coli</i> XL1-Blue	Stratagene	Δ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1 supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac [F' proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)]

2.1.2 Zelllinien

Zelllinie	Quelle	Ursprung
HeLa	Bartenschlager Labor, Heidelberg, Deutschland	Humanes Zervixkarzinom
HuH-7.5	Rice Laboratorien, Rockefeller Universität, US	Humanes Leberkarzinom

2.1.3 Nukleinsäuren

2.1.3.1 Plasmide

Das Plasmid pFL-J6/JFH1 lieferte die 5'-UTR-Sequenz für die meisten in der Liste aufgeführten Plasmide. Die Karten der hervorgehobenen Plasmide befinden sich im Anhang (Kapitel 6).

Name	Hergestellt von
pFL-J6/JFH1	Rice Labor, Rockefeller Universität, US
pUC18-Con-1-IRES-S1-HDVrz	D. Conrad, Niepmann Labor
pUC18-J6/JFH1-IRES-S1-HDVrz	A. Nieder-Röhrmann, Niepmann Labor
pUC18-J6/JFH1-IRES _{mut} -S1-HDVrz	A. Nieder-Röhrmann, Niepmann Labor
pUC18-J6/JFH1-IRES _{S1m} -S1-HDVrz	A. Nieder-Röhrmann, Niepmann Labor
pUC18-J6/JFH1-IRES _{S2m} -S1-HDVrz	A. Nieder-Röhrmann, Niepmann Labor
pUC18-J6/JFH1 IRES-hRIuc-3'-UTR	Eurofins MWG Operon, Ebersberg

pUC18-J6/JFH1 IRES _{mut} -hRluc-3'-UTR	N. Dünnes, Niepmann Labor
pUC18-J6/JFH1 IRES _{S1m} -hRluc-3'-UTR	A. Nieder-Röhrmann, Niepmann Labor
pUC18-J6/JFH1 IRES _{S2m} -hRluc-3'-UTR	A. Nieder-Röhrmann, Niepmann Labor
pUC18-J6/JFH1 IRES-hRluc- S3m	N. Dünnes, Niepmann Labor
pUC18-J6/ JFH1 IRES _{mut} -hRluc - S3m	N. Dünnes, Niepmann Labor
pUC18-J6/JFH1 IRES _{S1m} -hRluc-S3m	A. Nieder-Röhrmann, Niepmann Labor
pUC18-J6/JFH1 IRES _{S2m} -hRluc-S3m	A. Nieder-Röhrmann, Niepmann Labor
pGEM-4Z-FLuc-Poly(A)	L. Loew, Niepmann Labor
pGEM-4Z-SP6rev-FLuc-Poly(A)	A. Nieder-Röhrmann, Niepmann Labor
pUC18-J6/JFH1-IRES-SP6rev-S1-HDVrz	A. Nieder-Röhrmann, Niepmann Labor
pUC18-J6/JFH1-IRES _{mut} -SP6rev-S1-HDVrz	A. Nieder-Röhrmann, Niepmann Labor
pUC18-J6/JFH1 IRES _{S1m} -SP6rev-S1-HDVrz	A. Nieder-Röhrmann, Niepmann Labor
pUC18-J6/JFH1 IRES _{S2m} -SP6rev-S1-HDVrz	A. Nieder-Röhrmann, Niepmann Labor

2.1.3.2 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma biomers.net GmbH, Ulm, synthetisiert. Die LNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Exiqon, Vedbaek, Dänemark, hergestellt.

2.1.3.2.1 DNA-Oligonukleotide

Bezeichnung	[bp]	Sequenz (5'-3')	Verwendung
Cloning HCVcc IRES FWD	46	GCAAAAAGCTTTAATACGACTCAC TATAGCCTGCCCCTAATAGGGG	PCR-Primer für die Klonierung der J6/JFH1- 5'-UTR in die pUC18- Con-1 IRES-S1-HDVrz Plasmid-DNA
Cloning HCVcc IRES RV	35	GCAAAGGATCCACGATCTGGCCG CCGCCCCGGAAC	
QC J6/JFH m1m2 fwd	59	CTCACTATAGACTGCCCCTAATA GGGGCGAGACTACGCAGTGAAT CTATCCCCTGTGAG	Mutagenese-Primer für S1mS2m in der 5'-UTR
QC J6/JFH m1m2 rev	59	CTCACAGGGGATAGATTCACTGC GTAGTCTCGCCCCTATTAGGGGC AGTCTATAGTGAG	
FW pUC18	18	CAAGGCGATTAAGTTGGG	PCR-Primer für 5'- UTR _{363 nt} (co-IP)
RV 5'-UTR co-IP (363 nt)	20	TGAGGTTTAGGATTTGTGCT	
LNA1m ¹⁾	16	G [*] +T [*] A [*] G [*] T [*] +C [*] T [*] G [*] A [*] C [*] A [*] A [*] T [*] G [*] +T [*] C	Blockierung von miR- Bindungsstelle S1m

LNA2m ¹⁾	13	G*G*A*+T*+A*G*G*T*T*C*A*+C*+T	Blockierung von miR-Bindungsstelle S2m
LNA-anti-miR122	15	+C*C*A*+T*T*G*+T*C*A*+C*A*C*+T*C*+C	Blockierung von miR-122
FW pUC18 neu	21	GCTGGCGAAAGGGGGATGTGC	PCR-Primer für Luciferase-DNA
RV hRLuc 3'-UTR	20	GGTCTCTCTGCAGATCATGT	PCR-Primer für Luciferase-DNA
Top SP6 RPA	30	CCGGTCATAGTGTACCTAAATACGCGTG	Oligos zur Klonierung von antisense SP6 in die pUC18-J6/JFH1-IRES (wt/mut)-S1-HDVrz Plasmid-DNA (RPA)
Bottom SP6 RPA	30	CCGGCACGCGTATTTAGGTGACACTATAGA	
Top SphI* Sp6	23	CATTTAGGTGACACTATAGATTA	Oligos zur Klonierung des SP6-Promoters in die pGEM-4Z FLuc Poly(A) Plasmid-DNA (RPA)
Bottom SphI* Sp6	27	GTACGTAAATCCACTGTGATATCTAAT	
RV +1000 bp SP6 RPA	20	GTATCCGGTAAGCGGCAGGG	PCR-Primer für antisense-DNA von HCV (RPA)
FW pGEM-4z	20	CAATTTACACAGGAAACAG	PCR-Primer für antisense-DNA von FLuc (RPA)
RV Fluc RPA	20	GGCCGCTTACAATTTGGACT	
FW QC S1S2m	55	CCTAATAGGGGCGACACTCCGCA GTGAATCTATCCCCTGTGAGGAACTACTGTCT	Mutagenese-Primer für S1S2m in der 5'-UTR
RV QC S1S2m	55	AGACAGTAGTTCCTCACAGGGGATAGATTCCTGCGGAGTGTGCGCCCTATTAGG	
FW QC S1mS2	55	CCTAATAGGGGCGAGACTACGCC ATGAATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCT	Mutagenese Primer für S1mS2 in der 5'-UTR
RV QC S1mS2	55	AGACAGTAGTTCCTCACAGGGGATGATTTCATGGCGTAGTCTCGCCCTATTAGG	
α-Sm1.1 ²⁾	16	GTAGTCTGACAAAGTC	Blockierung von miRNA-Bindungsstelle S1m (ohne 1. „G“ von Sm2)
α-Sm2.1 ²⁾	15	GGATAGATTCACTGC	Blockierung von miRNA-Bindungsstelle S2m (mit 1. „G“ von Sm2)
α-Sm1Sm2 ²⁾	31	GGATAGATTCACTGCGTAGTCTGACAAAGTC	Blockierung beider miRNA-Bindungsstellen S1mS2m

1) LNA™-Base: +G, +A, +T, +C, Phosphorothioat-DNA-Base: G*, A*, T*, C*

2) Modifikation: 2'-O-Methylierung

2.1.3.2.2 RNA-Oligonukleotide

Bezeichnung	[nt]	Sequenz (5'-3')
miR-122 mat	22	⑤UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG
miR-122*	22	⑤AACGCCAUUAUCACACUAAAUA
miR-124 mat	22	⑤UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA
miR-124*	22	⑤GUGUUCACAGCGGACCUU GAUU
miR-122m1 mat	22	⑤UGUAGUCUGACAAAGUCGUUUG
miR-122 m1*	22	⑤AACGACUUUAUCAGACUCAUA
miR-122m2 mat	22	⑤UGGAUAGUGACAACUGUGUUUG
miR-122 m2*	22	⑤AACGCAGUUAUCACUAUAAAUA

* Gegenstrang (*passenger strand*) zur Herstellung von microRNA-Duplexen

2.1.4 Nukleotide

Bezeichnung	Firma
Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ribonukleosid-Triphosphate (rNTPs)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
[α - 32 P]-rUTP (800 Ci/mmol, 1 mCi)	Perkin Elmer, Akron, US
m ⁷ GP ₃ G (methyliertes Capping-Nukleotid)	Jena Bioscience, Jena

2.1.5 Enzyme

Enzym	Firma
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
DNase I (RNase-frei)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
OneTaq® DNA-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
PfuTurbo® DNA-Polymerase	Agilent, Frankfurt am Main
PfuTurbo Cx Hotstart DNA-Polymerase	Agilent, Frankfurt am Main
Platinum® Pfx-Polymerase	Thermo Scientific, Darmstadt
Proteinase K	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Restriktionsendonukleasen, diverse	New England Biolabs, Frankfurt am Main
RNase A/T1-Mix	Thermo Scientific, Darmstadt
SP6-RNA-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
T7-RNA-Polymerase	Thermo Scientific, Darmstadt
	New England Biolabs, Frankfurt am Main

2.1.6 Größenstandards

2.1.6.1 DNA-Größenstandards

Der DNA-Größenstandard wird bei der Agarosegel-Elektrophorese für DNA und RNA verwendet.

Marker	Größen [bp]	Firma
HyperLadder I	10.000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 800, 600, 400, 200	Bioline, Lichtenfels
Low Range ssRNA Ladder	1000, 500, 300, 150, 80, 50	New England Biolabs, Frankfurt am Main

2.1.6.2 Protein-Größenstandards

Der Protein-Größenstandard wird bei der Polyacrylamidgel-Elektrophorese zum Nachweis von Argonaute-Protein 2 (Ago2) eingesetzt.

Marker	Größen [kDa]	Firma
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	180, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15, 10	Thermo Scientific, Darmstadt

2.1.7 Antikörper und Magnetische Beads

Antikörper/Magnetische Beads	Firma
AffiniPure goat-anti-Rat, LightChain*Specific	Jackson ImmunoResearch
goat-anti-PTBP1	Abcam, Cambridge, UK
Protein A Magnetic Beads	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Protein G Magnetic Beads	New England Biolabs, Frankfurt am Main
rabbit-anti-eIF3	Abcam, Cambridge, UK
rat-anti-Ago2, clone 11A9	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Streptavidin Magnetic Beads	New England Biolabs, Frankfurt am Main

2.1.8 Kits

Kit	Firma
NucleoSpin® Plasmid EasyPure	Macherey-Nagel, Düren
Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System	Promega, Mannheim
GeneJet Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific, Darmstadt
GeneJet Plasmid Maxiprep Kit	Thermo Scientific, Darmstadt
NucleoBond® PC100 Midiprep Kit	Macherey-Nagel, Düren
GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare, München
GeneJet Gel Extraction Kit	Thermo Scientific, Darmstadt
RNeasy® Mini Elute™ Cleanup Kit	Qiagen, Hilden
GeneJet RNA Cleanup and Concentration Micro Kit	Thermo Scientific, Darmstadt
SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate	Pierce, Thermo Scientific, Darmstadt
Firefly Assay Beetle-Juice	PJK, Kleinblittersdorf
Renilla Assay Renilla-Juice	PJK, Kleinblittersdorf
Qubit™ Assay Kits	Life Technologies GmbH, Darmstadt

2.1.9 Chemikalien und Reagenzien

Die nicht weiter aufgeführten Chemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Roche (Mannheim) bezogen.

Bezeichnung	Firma
Acrylamid-Lösung, Rotiphoese Gel 40 (19:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Acrylamid-Lösung, Rotiphoese Gel 40 (29:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Adenosin-5'-triphosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Bacto Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Gerbu Biotechnik, GmbH, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Fetal Bovine Serum (fötales Rinderserum, FBS)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Formamid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glutathion	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycoblue	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Lennox Broth (LB) Medium	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Lipofectamine 2000	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Milchpulver	EDEKA Krenschker, Gießen
Nonidet-40, Biochemica Ersatzprodukt	AppliChem GmbH, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin-Lösung (100 x)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
PBS (10 x)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Proteinase K [20 mg/ml]	New England Biolabs, Frankfurt am Main
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trizol® LS Reagent	Ambion® Life Technologies GmbH, Darmstadt
tRNA [10 mg/ml]	Thermo Scientific, Darmstadt
Trypsin-EDTA (0,5 %, 10 x)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Tween®20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Xylencyanolblau FF	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

2.1.10 Puffer

2.1.10.1 Kulturmedien und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Lennox Broth (LB) Medium	20 g/l	LB-Pulver
	@ 1 l	dH ₂ O
	Sterilisation durch Autoklavieren (15 min, 121 °C)	
LB-Agar-Platten	20 g/l	LB-Pulver
	2 % (w/v)	Bacto Agar LB-Medium
	@ 400 ml	dH ₂ O
	Sterilisation durch Autoklavieren (15 min, 121 °C)	

Transformations-Puffer (TFP) 1	30 mM	Kaliumacetat
	10 mM	CaCl ₂
	50 mM	MnCl ₂
	100 mM	RbCl ₂
	15 % (v/v)	Glycerol
	@ 120 ml dH ₂ O	
	Einstellen des pH-Wertes auf pH 5,8 mit 1 M Essigsäure (~ 140 µl); Sterilfiltrieren	
Transformations-Puffer (TFP) 2	10 mM	MOPS (pH 6,5)
	75 mM	CaCl ₂
	10 mM	RbCl ₂
	15 % (v/v)	Glycerol
	@ 120 ml dH ₂ O	
	Einstellen des pH-Wertes auf pH 6,5 mit 1 M KOH (≤ 10 µl); Sterilfiltrieren	
LB/MgSO ₄	250 ml	LB-medium
	20 mM	MgSO ₄
1 x PBS	Verdünnung von 10 x PBS in 1 x ddH ₂ O	
0,5 % Trypsin-EDTA	Verdünnung von 10 x 0,5 % Trypsin-EDTA in 1 x PBS	
10 % DMEM	50 ml	FBS
(10 % FBS, 1 % Pen/Strep)	5 ml	Pen/Strep
	in 500 ml	DMEM
Kryomedium	10 ml	FBS
(20 % FBS, 10 % DMSO)	5 ml	DMSO
	@ 50 ml	DMEM

2.1.10.2 Gel-Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	
10 x TBE (Tris-Borat-EDTA)	108 g	Tris
	55 g	Borsäure
	40 ml	0.5 M EDTA (pH 8,0)
	@ 1 l	ddH ₂ O
50 x TAE (Tris-Acetat-EDTA)	242 g	Tris
	57,1 ml	Essigsäure
	100 ml	0.5 M EDTA (pH 8,0)
	@ 1 l	ddH ₂ O

2.1.10.3 Nukleinsäure-Probenpuffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
RNA-Probenpuffer	80 % Formamid 10 % Glycerol 50 mM EDTA (pH 7,5) einige Körner Bromphenolblau und Xylencyanol @ 20 ml ddH ₂ O Aufbewahrung bei - 20 °C in 2 ml Aliquots
DNA-Probenpuffer	75 % Glycerin 50 mM EDTA (pH 8,0) einige Körner Bromphenoblau und Xylencyanol @ 20 ml dH ₂ O Aufbewahrung bei - 20 °C in 2 ml Aliquots

2.1.10.4 Co-IP-Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Co-IP-Lysepuffer	25 mM Tris-HCl (pH 7,5) 150 mM KCl 2 mM EDTA (pH 7,5) 0,5 mM DTT 0,5 % NP-40 @ 250 ml ddH ₂ O
Co-IP-Waschpuffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 300 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 0,05 % NP-40 @ 500 ml ddH ₂ O
Proteinase K-Puffer	200 mM Tris-HCl (pH 7,5) 300 mM NaCl 25 mM EDTA (pH 7,5) 2 % SDS @ 50 ml ddH ₂ O
Fixierlösung	7,5 % Essigsäure 5 % Ethanol @ 1 l dH ₂ O

2.1.10.5 SDS-PAGE-Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
30 % Acrylamid-Lösung	Verdünnung von 150 ml Rotiphorese Gel (19:1) mit dH ₂ O in einem Endvolumen von 200 ml
Trenngel-Puffer (pH 8,8)	90,75 g Tris @ 400 ml dH ₂ O Einstellen des pH-Wertes auf 8,8 mit HCl; Auffüllen auf 500 ml Gesamtvolumen mit dH ₂ O
Sammelgel-Puffer (pH 6,8)	90,75 g Tris @ 400 ml dH ₂ O Einstellen des pH-Wertes auf 6,8 mit HCl; Auffüllen auf 500 ml Gesamtvolumen mit dH ₂ O
10 % SDS (w/v)	5 g Natriumdodecylsulfat (SDS) @ 50 ml dH ₂ O
10 % APS	0,1 g Ammoniumpersulfat (APS) @ 10 ml dH ₂ O
10 x SDS-Laufpuffer	10 g SDS 30 g Tris 144 g Glycin @ 1 l dH ₂ O Für 1 x SDS Laufpuffer 1:10 mit dH ₂ O verdünnen
4 x SDS-Probenpuffer	20 % Glycerol 20 % β-Mercaptoethanol 60 % 10 % SDS 125 mM Tris einige Körner Bromphenolblau @ 25 ml ddH ₂ O

2.1.10.6 Western Blot-Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Kathoden-Puffer	3 g Tris @ 800 ml dH ₂ O Einstellen des pH-Wertes auf 9,4 mit HCl 100 ml Methanol @ 1 l dH ₂ O
Anoden-Puffer I	36,3 g Tris @ 800 ml dH ₂ O Einstellen des pH-Wertes auf 10,4 mit HCl

	100 ml @ 1 l	Methanol dH ₂ O
Anoden-Puffer II	3 g @ 800 ml Einstellen des pH-Wertes auf 10,4 mit HCl 100 ml @ 1 l	Tris dH ₂ O Methanol dH ₂ O
10 x TBS	60,5 g 87,6 g @ 800 ml Einstellen des pH-Wertes auf 7,5 mit HCl @ 1 l	Tris NaCl dH ₂ O dH ₂ O
TBST	Für 1 x TBS 1:10 mit dH ₂ O verdünnen 0,25 % (v/v) 1 l	Tween20 1 x TBS
Blockierungspuffer	10 % (w/v) 100 ml	Milchpulver 1 x TBST

2.1.10.7 Puffer für die Elektroporation

Bezeichnung	Zusammensetzung
Zytomix	120 mM KCl 0,15 mM CaCl ₂ 10 mM K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ (pH 7,6) 25 mM HEPES (pH 7,6) 2 mM EGTA (pH 7,6) 5 mM MgCl ₂ @ 475 ml ddH ₂ O Sterilfiltration; kurz vor Gebrauch Zugabe von 2 mM ATP (pH 7,6) und 5 mM Gluthathion (pH 7,6)

2.1.10.8 Electrophoretic Mobility Shift Assay-Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
5 x Hybridisierungspuffer	500 mM HEPES (pH 7.5) 500 mM KCl 25 mM MgCl ₂ @ 50 ml ddH ₂ O

2 x Gelladepuffer	60 %	Glycerol
	1 x	TBE
	12 mM	MgCl ₂
	@ 50 ml	ddH ₂ O

2.1.10.9 RNase Protection Assay-Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Elutionspuffer	2 M	Natriumacetat
	1 %	SDS
Hybridisierungspuffer	80 %	Formamid
	40 mM	PIPES (pH 6,4)
	400 mM	NaCl
	1 mM	EDTA (pH 8)
	@ 50 ml	ddH ₂ O
	Aufbewahrung bei - 20 °C in 5 ml Aliquots	
RNase-Reaktionspuffer	10 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	5 mM	EDTA (pH 8)
	300 mM	NaCl
	@ 200 ml	ddH ₂ O

2.1.11 Spezielle Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
Chromatographie Papier 3MM (Whatman Paper)	VWR, Darmstadt
Cryo-Röhrchen	TTP, Schweiz
Elektroporationsküvetten (4 mm)	Bio-Rad, München
Mikrotiterplatte (6-wells)	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatte, Black/White Isoplate-96	Perkin Elmer, Akron, US
Pipettenspitzen, mit Filter (10 µl – 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, ohne Filter (10 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
PVDF Membran, Immobilon-P (0,45 µm)	Millipore, Billerica, US
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (0,2 ml – 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilme, CL-XPosure TM (18 cm x 24 cm)	Thermo Scientific, Darmstadt
Serologische Pipetten (5 ml – 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen (100 mm x 20 mm)	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.12 Geräte

Gerät	Firma
Bi-Destille, Destamat	Heraeus, Hanau
Blotapparatur, Fastblot B43/B44	Biometra, Göttingen
CO ₂ -Inkubator, Serie CB	Binder GmbH, Tuttlingen
Digitales pH-Meter 644	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
Elektrophorese Netzgerät, EPS 500/400	Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden
Elektrophorese Netzgerät, Power Pac 1000	Bio-Rad, München
Elektroporator, Gene Pulser Xcell™	Bio-Rad, München
Fluorometer, Qubit™	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Geiger-Zähler, LB 124	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad
Gel-Dokumentationssystem, Gel-DocXR	Bio-Rad, München
Geltrockner, Diaphragm Pump	Vacuumbrand GmbH & Co, Wertheim
Heizblock MBT 250	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
Heiz-Magnetrührer US152	Stuart, Stone, UK
Horizontalschüttler 3017	GFL, Burgwedel
Inkubator für Bakterienkulturen, Certomat® H	B. Braun, Austin, US
Inkubator für Petrischalen, B15	Thermo Scientific GmbH, Dreieich
Kippschüttler, Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge, Multifuge 3L-R	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge, Avanti JXN-26	Beckman Coulter, Brea, US
Kühlzentrifuge-Rotoren JA-10, JA-25.50	Beckman Coulter, Brea, US
MagnaRack™	Invitrogen, Karlsruhe
Mikropipetten (2µl–1000 µl)	Gilson, Middleton, US
Mikroskop, Leica DM IL invers	Leica Microsystems, Wetzlar
Mini-Gelsysteme	von Keutz, Reiskirchen
Petrischalen Inkubator, B15	Thermo Scientific GmbH, Darmstadt
PCR-Maschine, T1 Thermocycler/TProfessional	Biometra, Göttingen
PCR-Maschine, Design Artefakt	Industriekultur, Darmstadt
Phosphor Imager, Cyclone® Plus	Perkin Elmer, Akron, US
Pipettierhilfe	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Rotator, IKA® Loopster Basic	IKA Labortechnik, Staufen
Sequenziergel-Apparatur	von Keutz, Reiskirchen
Sterilbank, Lamin Air HA 2448 BS	Heraeus, Hanau

Multimode Reader, Tecan infinite M200	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Thermoschüttler MB-102	Bioer, Hangzhou, China
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
Zählkammer, Neubauer- <i>improved</i> (0,1 mm Tiefe)	Superior Marienfeld, Lauda Königshofen

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Bakterienstämme

Die *E.coli*-Stämme XL1-Blue und DH5 α wurden für die Transformation von DNA verwendet. Durch die fehlende Endonuklease (*endA*) Aktivität wird die Ausbeute sowie die Qualität der präparierten DNA erhöht. Die Rekombinase (*recA*) Mutation sorgt für eine gesteigerte Insert-Stabilität. Darüber hinaus besitzt der Stamm XL1-Blue eine Tetracyclin-Resistenz als Selektionsmarker.

2.2.1.2 Kultivierung von *E.coli*-Stämmen

Die Kultivierung der verschiedenen *E.coli*-Stämme erfolgt auf LB-Agar-Platten oder in Flüssigkultur mit LB-Medium. Da die verwendeten Plasmid-Konstrukte eine Ampicillin-Resistenz tragen, werden dem Flüssig- und Nährmedium 150 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin zugegeben. Die Bakterienkulturen werden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.2.1.3 Transformation von *E.coli* Stämmen

2.2.1.3.1 Herstellung von chemisch kompetenten Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien erfolgt über die klassische CaCl_2 -Methode, bei der die zu transformierende Plasmid-DNA durch Hitzeschock in die Bakterienzelle eingebracht wird.

Für die erste Übernachtskultur wird ein Klon in 5 ml LB-Medium überführt und bei 37 °C in einem Schüttelinkubator kultiviert. Die Vorkultur wird anschließend 1:10 in 250 ml LB-Medium (mit 20 mM MgSO_4) verdünnt. Die Kultur wird bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von ca. 0,6 auf dem Schüttler inkubiert. Zum Pelletieren der Zellen werden diese bei 4 °C für 3 min bei 4500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird in 100 ml eiskalten Transformations-Puffer 1 (TFB1) resuspendiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis wird die Zellsuspension erneut bei 4500 rpm und 4 °C für 5 min pelletiert. Nach Verwerfen des Überstands wird das Pellet in 10 ml eiskaltem Transformations-Puffer 2 (TFB2) gelöst und für 15–30 min auf Eis gehalten. Die chemisch kompetenten Zellen werden in 100 μl Aliquots aufgeteilt, in Flüssigstickstoff eingefroren und bei - 40 °C aufbewahrt.

2.2.1.3.2 Calciumchlorid-Transformation von DNA in kompetente Zellen

Die Transformation von chemisch kompetenten Bakterienzellen erfolgt über Zugabe von 0,01–0,001 pmol Plasmid-DNA oder 0,05–0,1 pmol einer Ligationsreaktion zu 50 µl Zellsuspension. Für Mutagenese-Produkte werden 30 µl des Reaktionsansatzes zu 100 µl Suspension gegeben. Zunächst wird die DNA mit den Bakterien für 30 min bei 4 °C inkubiert. Durch einen Hitzeschock für 2 min bei 42 °C oder 45 °C (XL1-Blue) wird anschließend die Aufnahmefähigkeit der Zellen für Fremd-DNA kurzzeitig erhöht. Vermutet wird, dass eine Art Neutralisierung der negativen Ladung der zu transfizierenden DNA durch das Ca^{2+} -Ion eintritt, wodurch die Plasmid-DNA einfacher durch die negativ geladene Zellmembran gelangen kann.

Nach weiteren 2 min bei 4 °C werden die Zellen mit 1 ml LB-Medium ohne Antibiotika für 1 Stunde (h) bei 37 °C auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Die Zellen werden bei 4000 rpm für 2 min pelletiert und 9/10 des Überstandes verworfen. Nach Resuspension der Zellen im restlichen Medium werden diese auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin als Selektionsmarker ausplattiert und umgedreht über Nacht bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle wird je ein Ansatz ohne DNA mitgeführt. Bei Ansätzen mit Ligationsprodukten wird zusätzlich eine pUC18- oder pUC19-Plasmid-DNA als Positivkontrolle transformiert.

2.2.2 Arbeiten mit DNA

2.2.2.1 DNA-Synthese

2.2.2.1.1 Standard Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*) ist eine Methode zur spezifischen *in vitro*-Amplifikation definierter DNA-Fragmente, mit spezifischer Sequenz und Größe. Die vermehrten DNA-Fragmente können entweder für Klonierungen oder als Matrize für die *in vitro*-Transkription verwendet werden.

Für die PCR werden zwei, die Zielsequenz flankierende, kurze DNA-Oligonukleotide (Primer) eingesetzt, die komplementär zum 5'- bzw. 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts sind (Tabelle 2.1).

Im ersten Schritt des Zyklus wird der DNA-Doppelstrang bei 94°C denaturiert. Das Binden der komplementären Primer (Hybridisierung) findet durch ein Absenken der Temperatur statt. Diese liegt 5 °C unter der Schmelztemperatur (T_m) des Primers mit dem geringeren Wert. Zur Amplifikation der DNA wird die hitzestabile *Taq*-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* mit einem Temperaturoptimum von 68 °C eingesetzt. Dieser Zyklus wird 30 Mal

wiederholt, wodurch es zu einer exponentiellen Vermehrung des DNA-Fragments kommt (Tabelle 2.2).

Tabelle 2.1: Standardreaktionsansatz für die PCR.

Bestandteil	Endkonzentration
OneTaq® Standard Reaction Buffer	1 x
dNTPs	0,25 mM
Primer <i>forward</i>	0,5 pmol/μl
Primer <i>reverse</i>	0,5 pmol/μl
DNA-Template	1 ng/μl
OneTaq®-Polymerase	0,625 U/μl
@ 50 μl mit ddH ₂ O	

Tabelle 2.2: Standard PCR-Programm.

Schritt	Temperatur	Zeit [min:s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	05:00	1
Denaturierung	94 °C	01:00	
Hybridisierung	Primer-spezifisch T _m -5	00:30	30
Elongation	68 °C	1 min/kb	
Finale Elongation	68 °C	05:00	1

2.2.2.1.2 Präparative PCR

Die präparative PCR dient der Herstellung großer Mengen bestimmter DNA-Fragmente für Klonierungen oder zur Aufreinigung aus Agarosegelen (Kapitel 2.2.2.3.3). Das Prinzip und das PCR-Programm sind identisch zur Standard-PCR. Auch der Reaktionsansatz entspricht dem der Standard-PCR, jedoch wird hierfür ein größeres Volumen eingesetzt. Für eine präparative PCR werden normalerweise etwa 600–1200 μl, d.h. 12–24 PCR Ansätze, verwendet, entsprechend der benötigten Menge für weitere Applikationen.

2.2.2.2 Modifikation von DNA (Mutagenese und Klonierung)

2.2.2.2.1 Zielgerichtete Mutagenese mittels PCR

Über die *in vitro*-Mutagenese können, mittels einer speziellen PCR, Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen in eine Plasmid-DNA eingefügt oder aus dieser entfernt werden. Das Plasmid wird hierbei vollständig amplifiziert. Das Protokoll stammt aus dem frei zugänglichen *QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* von Stratagene.

Hierbei werden zwei jeweils komplementäre Primer verwendet, welche mittig die gewünschte Mutationssequenz tragen. Diese sollte von jeweils 10–15 nt zum Vektor homologen Sequenzabschnitten flankiert werden. Die Oligonukleotide sollten dabei eine Gesamtlänge von 45 nt nicht überschreiten und eine T_m von 78 °C oder mehr haben. Das Primerpaar wird nach Anlagerung an die doppelsträngige Plasmid-DNA durch eine spezielle DNA-Polymerase mit hoher Korrekturleserate verlängert (Tabelle 2.3, Tabelle 2.4).

Während der Inkorporation der Primer wird ein mutiertes Plasmid synthetisiert. Nach der PCR wird dem Reaktionsansatz die DpnI-Endonuklease zugegeben. Dieses Enzym schneidet methylierte oder hemimethylierte DNA, sodass die mutierte, nicht-methylierte DNA gegen die parentale, aus *E.coli* isolierte und damit methylierte Plasmid-DNA selektiert wird. Der Erfolg der Mutagenese kann auf einem Agarosegel (Kapitel 2.2.4.3.1) überprüft werden, indem 1/5 des PCR-Produkts vor und nach dem DpnI-Verdau aufgetragen wird. Das Vorhandensein einer DNA-Bande nach enzymatischem Verdau deutet auf eine erfolgreich amplifizierte, mutierte Plasmid-DNA hin. Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms im Reaktionsansatz werden 30 µl in *E.coli* XL1-Blue- oder DH5α-Zellen transformiert (Kapitel 2.2.1.3.2).

Tabelle 2.3: Standardreaktionsansatz für die Mutagenese.

Bestandteil	Endkonzentration
PfuTurbo® Reaction Buffer	1x
dNTPs	0,25 mM
Primer 1	125 ng
Primer 2	125 ng
DNA-Template*	5-50 ng
PfuTurbo® Polymerase**	2,5 U/µl
@ 50 µl mit ddH ₂ O	

* Für jede Mutation werden üblicherweise 25–50 ng Template eingesetzt.

** Sofern diese keine *hotstart* Polymerase ist, wird sie erst nach der initialen Denaturierung zum Reaktionsansatz gegeben.

Tabelle 2.4: Modifiziertes *in vitro*-Mutagenese-PCR-Programm für schwierige Mutationen.

Schritt	Temperatur	Zeit [min:s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	99 °C	02:00	1
Pause für Zugabe der Polymerase	90 °C	02:00	1
Denaturierung	95 °C	00:30	10
Hybridisierung	40 °C	00:45	
Elongation	68 °C	2 min/kb	
Denaturierung	95 °C	00:30	20
Hybridisierung	40 °C	00:45	
Elongation	72 °C	1 min/kb	
Finale Elongation	72 °C	10:00	1

2.2.2.2.2 Enzymatische Modifikation von DNA

2.2.2.2.2.1 Restriktionsverdau von DNA

Der Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen dient u.a. der Analyse von Plasmid-DNA, dem Nachweis der Identität und Integrität bestimmter Plasmide oder der Herstellung von DNA-Fragmenten. Es können, je nach Enzym, DNA-Stücke mit Sequenzüberhängen (*sticky ends*) oder glatten Enden (*blunt ends*) entstehen. Enthält eine bestimmte DNA-Sequenz (Insert) nicht die benötigten Schnittstellen zum Klonieren in eine Ziel-Plasmid-DNA (Vektor), können diese über PCR mit entsprechenden Primern, welche die Sequenz für die Schnittstelle tragen, eingebracht werden.

Für jede Restriktionsendonuklease sind die optimalen Reaktionsbedingungen den Herstellerprotokollen zu entnehmen. Die Enzymmenge richtet sich dabei nach der eingesetzten Menge an DNA, die wiederum je nach Verwendungszweck variieren kann. In einem 50 µl Reaktionsansatz werden üblicherweise 1 µg DNA mit 1 U Restriktionsenzym geschnitten. Nachdem der Ansatz für 1–2 h bei dem entsprechenden Temperaturoptimum inkubiert wurde, wird ein Teil der Probe auf dem Agarosegel (Kapitel 2.2.4.3.1) nach Fragmentgröße und auf Erfolg der Reaktion überprüft. Je nach Verwendung der Fragmente wird die DNA entweder über Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Präzipitation (Kapitel 2.2.2.3.4.2, 2.2.2.3.4.3) oder aus einem präparativen Agarosegel (Kapitel 2.2.2.3.3) gereinigt. Im Fall der Vektorpräparation wird nach der Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym die DNA dephosphoryliert (Kapitel 2.2.2.2.2.2) und anschließend aus dem Gel gereinigt.

2.2.2.2.2 Entfernung von 5'-Phosphatresten (Dephosphorylierung)

Während des Restriktionsverdaus werden an den DNA Fragmenten 5'-Phosphatreste hinterlassen, die zu einer Rückligation des linearisierten Vektors führen können. Um dies zu verhindern, wird nach der Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym eine *Antarctic Phosphatase* eingesetzt (1 U/μg DNA). Nach einer Inkubation von 1 h bei 37 °C wird die Phosphatase bei 65 °C für 15 min inaktiviert. Die dephosphorylierten linearen Vektoren können dann nach Aufreinigung aus einem präparativen Agarosegel (Kapitel 2.2.2.3.3) in eine Ligationsreaktion (Kapitel 2.2.2.2.3) eingesetzt werden.

2.2.2.2.3 Ligation von DNA Fragmenten

Die Ligation bezeichnet das Zusammenfügen von zwei DNA-Fragmenten mit überhängenden oder glatten Enden. Hierbei katalysiert die T4-DNA-Ligase die Bildung der Phosphodiester-Bindung zwischen dem 5'-Phosphat des einen und dem 3'-OH-Ende des anderen DNA-Moleküls durch ATP-Hydrolyse.

Für eine Ligationsreaktion von 20 μl werden verschiedene Vektor:Insert-Verhältnisse verwendet, wobei konstant 25 ng Vektor eingesetzt werden. Die Menge des einzuklonierenden Fragments ist abhängig von seiner Länge und der Vektorgröße. Die benötigte Menge Insert wird mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Menge Insert [ng]} = 5 \times \text{Menge Vektor [ng]} \times \text{Länge Insert [bp]} / \text{Länge Vektor [bp]}$$

Die Konzentration der DNA-Fragmente wurde zuvor mit fluorometrischer Messung bestimmt (Kapitel 2.2.4.1). Die Ligationsreaktion enthält, neben den DNA-Fragmenten und dem Reaktionspuffer für das Enzym, 400 U T4-DNA-Ligase. Nach 3–4 h bei Raumtemperatur wird das Enzym bei 65 °C für 10 min hitzeinaktiviert. Die Hälfte des Reaktionsansatzes wird anschließend in *E.coli* DH5α-Zellen transformiert (Kapitel 2.2.1.3).

2.2.2.3 Präparation und Konzentrierung von DNA

2.2.2.3.1 Plasmid-DNA-Minipräparation

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen in kleineren Mengen werden das *NucleoSpin® Plasmid EasyPure* (Macherey-Nagel) und das *GeneJet Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers verwendet. Alle benötigten Puffer und Materialien sind Bestandteile der Kits. Hiermit können aus 1–10 ml Flüssigkultur bis zu 20 μg DNA gewonnen werden.

Die Reinigung erfolgt aus einer Übernachtskultur von 5 ml transformierten Bakterien (Kapitel 2.2.1.3.2). Durch alkalische Lyse werden die Zellen aufgebrochen und die chromosomale sowie Plasmid-DNA denaturiert. Die Zellbestandteile und die chromosomale DNA werden anschließend über Kaliumacetat präzipitiert und durch Zentrifugation von der Plasmid-DNA getrennt. Die wässrige Lösung wird auf die Säule geladen und die Plasmid-DNA bei niedrigem pH-Wert und hohen Salzkonzentrationen an die Säule gebunden. Nach dem Waschen der Säule werden zum Eluieren 50 µl ddH₂O auf die Säule gegeben und die gelöste Plasmid-DNA bei - 20 °C aufbewahrt.

Für Ligationsprodukte wird nach der Minipräparation die Sequenz der isolierten Plasmid-DNA überprüft (Kapitel 2.2.4.2).

2.2.2.3.2 Plasmid-DNA-Maxipräparation

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen in großen Mengen werden das *NucleoBond® PC100 Midiprep Kit* (Macherey-Nagel) und das *GeneJet Plasmid Maxiprep Kit* (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers verwendet. Alle benötigten Puffer und Materialien sind Bestandteile der Kits.

Die Reinigung erfolgt aus einer Übernachtskultur von 300 ml transformierten Bakterien nach den Grundlagen der Minipräparation (Kapitel 2.2.2.3.1). Zum Lösen der Plasmid-DNA werden 1–1,7 ml Elutionspuffer eingesetzt. Die gereinigte DNA kann so über mehrere Monate bei - 20 °C oder - 40 °C aufbewahrt werden. Die Sequenz der isolierten Plasmid-DNA wird überprüft (Kapitel 2.2.4.2).

2.2.2.3.3 Reinigung von DNA-Fragmenten über präparative Agarosegele

Die Reinigung von DNA über präparative Agarosegele erfolgt nach dem Restriktionsverdau oder der PCR. Die Methode dient der Trennung der gewünschten DNA-Fragmente von den weiterhin in der Lösung befindlichen unerwünschten DNA-Fragmenten. Die Auftrennung der DNA-Produkte erfolgt nach dem Protokoll der analytischen Agarosegel-Elektrophorese (Kapitel 2.2.4.3.1), bis auf den Unterschied, dass die Gele 1,4-fach voluminöser und die Taschen zum Beladen breiter sind. Die Elektrophorese läuft bis das gewünschte Fragment von den anderen Fragmenten abgetrennt ist. Dies kann mithilfe der Farbmarker Bromphenolblau und Xylencyanol abgeschätzt werden. Nach dem Inkubieren in der Ethidiumbromidlösung wird das Gel auf eine auf eine Glasplatte überführt, und unter UV-Licht wird die gewünschte Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die zwischenliegende Glasplatte soll mögliche Mutationen in der DNA Sequenz reduzieren, die durch das UV-Licht verursacht werden können.

Die DNA wird aus dem Gel mithilfe des *GeneJet Gel Extraction Kits* (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers extrahiert und gereinigt. Die Größe und Reinheit der isolierten DNA wird mittels analytischer Agarosegel-Elektrophorese überprüft und ihre Qualität und Konzentration mithilfe der fluorometrischen Messung (Kapitel 2.2.4.1) kontrolliert.

2.2.2.3.4 Reinigung und Konzentrierung von DNA Matrizen für die *in vitro*-Transkription

2.2.2.3.4.1 Proteinase K-Verdau

Die Proteinase K ist eine Serinprotease. Sie kann durch die endolytische Spaltung von Proteinen zur Entfernung von DNA-bindenden Proteinen sowie Enzymen (Ribonukleasen) genutzt werden. Plasmide oder PCR-Produkte, die als Matrizen für die *in vitro*-Transkription dienen sollen, werden mit 10 µl Proteinase K (20 mg/ml) und mit 250 µl Proteinase K-Puffer für 15 min bei 65 °C inkubiert. Zur Entfernung des Enzyms werden die behandelten DNA-Proben mittels Phenol/Chloroform-Extraktion (Kapitel 2.2.2.3.4.2) gereinigt und durch die Zugabe von Ethanol gefällt (Kapitel 2.2.2.3.4.3).

2.2.2.3.4.2 Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Reinigung von Nukleinsäuren von Proteinen werden organische Lösungsmittel wie Phenol und Chloroform verwendet. Durch das Zwei-Phasen-System, bei dem sich die Proteine in der unteren organischen Phase befinden und die DNA in der oberen wässrigen Lösung vorliegt, kann die Nukleinsäure von Proteinen getrennt werden.

Zu dem zu reinigenden Ansatz wird ein Volumen Phenol zugegeben. Nach 2 min Invertieren wird bei 14.000 rpm für 2 min zentrifugiert. Durch das Phenol werden die Proteine denaturiert. Die obere, wässrige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß mit einem Volumen Phenol/Chloroform (1:1) überführt. Nach erneutem Invertieren und Zentrifugieren wird die obere Phase mit einem Volumen Chloroform gemischt, um das restliche Phenol zu entfernen. Die obere Phase, mit der proteinfreien Nukleinsäure, wird anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Nukleinsäure mit Ethanol gefällt (Kapitel 2.2.2.3.4.3).

2.2.2.3.4.3 Alkoholfällung von Nukleinsäuren (Präzipitation)

Die Fällung von Nukleinsäuren mit Alkoholen wie Ethanol und Isopropanol dient der Reinigung und Konzentrierung der DNA oder RNA. Durch Zugabe von einwertigen Ionen bilden die Nukleinsäuren dann ungeladene Salze, die in Alkohol ausfallen.

Zum Phenol/Chloroform-gereinigten Ansatz werden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und das 2,5-fache Volumen Ethanol (100 %) zugegeben. Wurde zuvor ein Proteinase K-Verdau (Kapitel 2.2.2.3.4.1) durchgeführt, so werden 1/25 Volumen 5 M Natriumchlorid zum Fällen verwendet. Das SDS im Proteinase K-Probenpuffer bleibt durch das Chlorid auch noch bei 70 % Ethanol löslich und verhindert eine nachträgliche Verunreinigung der Nukleinsäure durch SDS.

Die Präzipitation erfolgt bei - 20 °C über Nacht oder bei - 40 °C für mindestens 1 h. Nach dem Zentrifugieren bei 14.000 rpm bei 4 °C für 30 min wird der Überstand abgenommen und das DNA-Pellet zweimal mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Im Fall von gefällter RNA wird zweimal mit 80 %-igem Ethanol gewaschen. Danach wird der Überstand abgenommen und das Pellet getrocknet. Die Nukleinsäure wird dann, je nach Ausgangsmenge, in 50–100 µl ddH₂O gelöst.

2.2.3 Arbeiten mit RNA

Das Arbeiten mit RNA stellt besondere Ansprüche an Reagenzien und die verwendeten Materialien. Da Ribonukleasen (RNasen) nicht vollständig durch normale Hitzesterilisation wie das Autoklavieren inaktiviert werden können, werden alle Glaswaren sowie Spatel mit Alufolie bedeckt und bei 280 °C über Nacht gebacken. Alle Plastikwaren werden über Nacht in einer Lösung aus 0,1 M NaOH und 1 mM EDTA inkubiert und anschließend mit bidestilliertem, autoklaviertem Wasser gewaschen. Die Deckel und Rührfische werden mit Alufolie umhüllt und zusätzlich autoklaviert. Alle Lösungen werden nur in sterilen Flaschen und Chemikalien angesetzt, die mit RNase-freiem Material in Berührung kamen. Zudem werden für die folgenden beschriebenen Methoden nur Nuklease-freie Pipettenspitzen mit Filtereinsätzen verwendet.

2.2.3.1 RNA-Synthese

2.2.3.1.1 Herstellung von DNA-Matrizen für die *in vitro*-Transkription

Die für die Transkription verwendeten DNA-Fragmente werden entweder über Restriktionsverdau (Kapitel 2.2.2.2.1) linearisiert (Plasmid-DNA) oder über PCR präparativ (Kapitel 2.2.2.1.2) hergestellt. Im Vergleich zur Transkription von der Plasmid-DNA können

so die Sequenzenden präzise und variabel über die Primer gewählt werden, wenn z.B. keine Terminatoren in den entsprechenden Sequenzabschnitten vorliegen. Zudem können zusätzliche Sequenzen über die Primer in das generierte DNA-Template eingefügt werden, z.B. Promotorregionen.

In dieser Arbeit dient die PCR der Herstellung authentischer Enden für die 3'-UTR. Lediglich die pGEM-4Z-FLuc-Poly(A) Plasmid-DNA (Anhang 6.1.4), wird nach dem poly(A)-Bereich mit *SpeI* geschnitten und damit linearisiert. Jedes Plasmid-Konstrukt enthält dabei bereits entweder eine T7- oder SP6-Promotorregion.

Nach der Linearisierung oder PCR wird das Fragment gezielt aus dem Agarosegel ausgeschnitten und somit von restlichen unspezifischen DNA-Fragmenten getrennt. Durch die nachfolgende Reinigung mittels *GeneJet Gel Extraction Kit* (Thermo Scientific) werden RNasen entfernt. Nach Bestimmung der DNA-Konzentration (Kapitel 2.2.4.1) kann das Template in die *in vitro*-Transkription (Kapitel 2.2.3.1.2, 2.2.3.1.3) eingesetzt werden.

2.2.3.1.2 Standard *in vitro*-Transkription mit T7-RNA-Polymerase

Zur Transfektion von eukaryotischen Zellen (Kapitel 2.2.5.6) mit HCV-RNA für den Luciferase-Assay (Kapitel 2.2.6.4) wird das mittels PCR hergestellte DNA-Template für die *in vitro*-Transkription verwendet. Die Synthese der RNA erfolgt dabei durch die T7-RNA-Polymerase. Die RNase-freien Reaktionskomponenten werden bei Raumtemperatur pipettiert, um eine mögliche Präzipitation der DNA bei 0 °C durch das im Transkriptionspuffer enthaltene Spermidin zu verhindern. Die Konzentrationen aller Bestandteile sind der Tabelle 2.5 zu entnehmen. Da die Stabilität von Dithiothreitol (DTT) mit zunehmenden Auftau- und Einfrierzyklen abnimmt, wird zu jeder Reaktion extra 10 mM DTT gegeben. Die Transkriptionsreaktion läuft für 90 min bei 37 °C. Nach etwa 1 h wird erneut T7-Polymerase hinzugegeben, um mögliche Aktivitätsverluste auszugleichen.

Tabelle 2.5: Zusammensetzung einer Standard-*in vitro*-Transkriptionsreaktion.

Bestandteil	Endkonzentration
DNA-Template	10 ng/μl
Transkriptionspuffer	1 x
DTT*	10 mM
rNTPs (A, G, C, U)	0.5 mM (jeweils)
T7 RNA-Polymerase	1,6 U
@ 100 μl mit ddH ₂ O	

* Zugabe bei Puffern älter als einen Monat.

Anschließend wird nach DNase-Verdau (Kapitel 2.2.3.2.1) die RNA über Säulen (Kapitel 2.2.3.2.2) gereinigt und die Konzentration mittels Qubit™ bestimmt (Kapitel 2.2.4.1). Zur Kontrolle wird die Integrität der RNA auf einem Agarosegel (Kapitel 2.2.4.3.1) überprüft.

2.2.3.1.3 *In vitro*-Transkription von radioaktiv markierter RNA

Zur Transfektion von eukaryotischen Zellen (Kapitel 2.2.5.6) mit radioaktiv markierter HCV-RNA für die co-IP (Kapitel 2.2.6.1) und den *RNAse Protection Assay* (RPA) (Kapitel 2.2.7.1) wird die Template-DNA über die T7- oder SP6-RNA-Polymerase *in vitro* transkribiert. Der Unterschied zur Standard-Synthese (Kapitel 2.2.3.1.2) ist die Zugabe von 0.625 µM [α-³²P]-rUTP (800 Ci/mmol). Zudem wird die Konzentration der rUTPs im Reaktionsansatz verringert (Tabelle 2.6). Je nach Länge der zu transkribierenden RNA und Menge der eingesetzten DNA muss das Verhältnis zwischen rUTP:[α-³²P]-rUTP vorher getestet werden.

Tabelle 2.6: Zusammensetzung einer *in vitro*-Transkriptionsreaktion für radioaktiv markierte RNA.

Bestandteil	Endkonzentration
DNA-Template	8–16 ng/µl
Transkriptionspuffer	1 x
DTT*	10 mM
rNTPs (A, G, C)	0.5 mM (jeweils)
rUTPs	50–100 µM
[α- ³² P]-rUTP	0,625 µM
T7-RNA-Polymerase	1,6 U

@ 100 µl mit ddH₂O

* Zugabe bei Puffern älter als einen Monat.

Die Reaktion läuft für 90 min bei 37 °C für die T7-Polymerase bzw. 40 °C für die SP6-Polymerase.

Anschließend wird entweder direkt nach der Transkription (für co-IP-Experimente) oder nach DNase-Verdau (Kapitel 2.2.3.2.1) und anschließender Reinigung über ein präparatives denaturierendes Polyacrylamidgel (Kapitel 2.2.4.3.2) die Menge an synthetisierter RNA auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel nach Autoradiographie (Kapitel 2.2.8) abgeschätzt. Die Konzentration wird über das Verhältnis von inkorporierten zu freien radioaktiven Nukleotiden bestimmt:

$$\text{Menge RNA [pmol]} = \frac{(\text{c(rUTP) } [\mu\text{M}] \times \text{Reaktionsvolumen } [\mu\text{l}] \times \text{inkorporierte Nukleotide } [\%])}{(\text{inkorporierte } [\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-rUTPs } [\%] + \text{freie } [\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-rUTPs } [\%]) \times \text{Anzahl rUTPs in RNA}}$$

2.2.3.1.4 Synthese von RNA mit 5'-Cap-Nukleotid

Beim *capping* von Reporter-RNAs wird während der Transkription eine 7-Methyl-Guanosin-Kappe (m^7GP_3G) an das 5'-Ende der RNA angefügt. Dies dient der Imitation einer eukaryotischen mRNA in der Zelle, um ein schnelles Abbauen zu verhindern. In diesem Fall wird die Synthese einer mRNA mit einem 5'-Cap-Nukleotid für die interne Kontrolle des Luciferase-Assays (Kapitel 2.2.6.4) durchgeführt, um Transfektionsunterschiede in die späteren Auswertungen mit einrechnen zu können. Die Plasmid-DNA wurde zuvor linearisiert und gereinigt (Kapitel 2.2.2.2.1, 2.2.2.3.3) um nun in die Reaktion eingesetzt zu werden. Die poly(A)-Sequenz befindet sich bereits in der Sequenz, sodass eine anschließende Polyadenylierungsreaktion überflüssig ist.

Für diese spezielle *in vitro*-Transkription wird die Konzentration des rGTPs auf 2,5 mM herabgesetzt und zusätzlich 500 μM m^7GP_3G eingesetzt (Tabelle 2.5). Die Menge an eingetzter Template-DNA entspricht 10 ng/ μl . Die Reaktion läuft für 90 min bei 37 °C (T7-Polymerase) im Wasserbad ab. Anschließend wird nach DNase-Verdau (Kapitel 2.2.3.2.1) die RNA über ein Kit (Kapitel 2.2.3.2.2) gereinigt und die Konzentration mittels QubitTM bestimmt (Kapitel 2.2.4.1). Zur Kontrolle wird die Integrität der RNA auf einem Agarosegel (Kapitel 2.2.4.3.1) überprüft.

2.2.3.2 Präparation und Reinigung von RNA

2.2.3.2.1 DNase I-Verdau

Der DNase I-Verdau erfolgt nach *in vitro*-Transkriptionen (Kapitel 2.2.3.1), um restliche DNA-Rückstände zu entfernen und somit Re-Hybridisierungen mit der synthetisierten RNA bzw. um andere unerwünschte Einwirkungen auf die Versuche auszuschließen. Hierzu wird DNase I (0,1 U/ μl) und DNase I-Reaktionspuffer zum Reaktionsansatz pipettiert und anschließend für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Danach wird die RNA direkt über Säulen (Kapitel 2.2.3.2.2) oder aber ein präparatives denaturierendes Polyacrylamidgel (Kapitel 2.2.4.3.2) gereinigt.

2.2.3.2.2 Reinigung von RNA über *GeneJet RNA Cleanup*-Säulen

Zur Extraktion von RNA aus Reaktionsansätzen (ohne radioaktive Nukleotide) wird das *GeneJet RNA Cleanup and Concentration Micro Kit* (Thermo Scientific) nach Anweisungen des Herstellers verwendet. Aufgrund der Größe der präparativen Transkriptionsansätze (bis zu 1,6 ml), werden diese zusammengeführt und auf vier Säulen aufgeteilt (je 400 μl pro

Säule). Entsprechend wurde das Lösungsvolumen von 10 µl auf 4 x 10 µl erhöht. Die gereinigte RNA kann mehrere Monate bei - 20 °C gelagert werden. Die Konzentration kann mittels Qubit™ (Kapitel 2.2.4.1) bestimmt werden.

2.2.3.2.3 Präparative denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Reinigung von radioaktiv markierter RNA für den RPA (Kapitel 2.2.7.1) erfolgt über präparative denaturierende Polyacrylamidgele. Die Methode dient der Trennung der gewünschten RNA von möglicherweise re-hybridisierender DNA oder von weiteren unspezifischen RNA-Fragmenten. Die Auftrennung der RNA-Produkte erfolgt nach dem Protokoll der analytischen Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Kapitel 2.2.4.3.2), mit Ausnahme des etwa 1,5-fachen Gelvolumens und breiterer Taschen zum Beladen größerer Probenmengen (bis zu 200 µl). Vor der Reinigung wird ein Aliquot von 5 µl Transkriptionsansatz bei - 20 °C gelagert und später zusammen mit der gereinigten RNA zur Abschätzung des Nukleotideinbaus auf das Gel beladen. Zur Reinigung wird die restliche RNA 1:1 mit FA-Puffer gemischt und für 5 min bei 85 °C erhitzt. Die Elektrophorese, in 4 %- bzw. 6 %-igen Gelen läuft, bis das gewünschte Fragment von den anderen Fragmenten getrennt ist. Dies kann mithilfe des Farbmarkers Bromphenolblau sowie Xylencyanol abgeschätzt werden. Nach der Autoradiographie (Kapitel 2.2.8) kann der Röntgen-Film zum Abschätzen der Position der RNA-Bande im Gel verwendet werden. Die gewünschte Bande wird mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein 2 ml-Reaktionsgefäß mit 400 µl Elutionspuffer (Kapitel 2.1.10.9) überführt und über Nacht bei 19 °C und 1000 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Das Eluat wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 1 ml 100 % Ethanol für 1 h bei - 40 °C präzipitiert. Aufgrund der hohen Ammoniumacetat-Konzentration in dem Elutionspuffer muss kein weiteres Salz zur Unterstützung hinzugegeben werden. Nach 15 min Zentrifugation bei 16.400 rpm und 4 °C wird das RNA-Pellet zweimal mit 80 % Ethanol gewaschen. Anschließend wird das Pellet in Hybridisierungspuffer gelöst. Die Konzentration der gereinigten RNA wird auf einem Polyacrylamidgel nach der Autoradiographie abgeschätzt (Kapitel 2.2.3.1.3).

2.2.3.3 Hybridisierung von RNA

2.2.3.3.1 Herstellung von microRNA-Duplexen

Zur Transfektion eukaryotischer Zellen mit miRNA (miR) müssen diese als Duplexe vorliegen, um Effekte in der Zelle untersuchen zu können. Die 5'-phosphorylierten Einzelstränge wurden *in vitro* von Biomern synthetisiert. Zur Herstellung von miR-Duplexen

werden äquimolare Mengen (100 µM) der reifen Einzelstränge (miR mat und miR*) gemischt und in einem Thermocycler auf 90 °C erhitzt. Die Temperatur wurde dann um 1 °C pro Minute verringert bis auf 4 °C. Die hybridisierten miR-Duplexe können bei - 20 °C für einige Wochen aufbewahrt werden.

2.2.4 Nachweis von Nukleinsäuren

2.2.4.1 Fluorometrische Konzentrationsbestimmung (Qubit®)

Die Fluoreszenz-basierte Quantifizierung von Nukleinsäuren ist eine mögliche Alternative zur spektrophotometrischen Messung. Hierbei umfasst die Methode den Gebrauch eines Qubit™-Fluorometers und sensitiver, Nukleinsäure-spezifischer *Qubit™ Assay Kits*. Der Farbstoff im jeweiligen Kit emittiert Fluoreszenz nur, wenn dieser an das spezifische Zielmolekül (DNA, RNA oder Protein) gebunden hat. Durch die Detektion dieser Target-spezifischen Fluoreszenz wird der Effekt von Kontaminationen (degradiert DNA oder RNA) minimiert, der bei UV-Absorption basierter Quantifizierung eine größere Auswirkung auf die Messergebnisse hat.

Die Konzentrationsbestimmung wird nach Angaben des Herstellers mit den entsprechenden Kits für die Messung von DNA und RNA durchgeführt.

2.2.4.2 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Zur Bestimmung der Sequenz gereinigter Plasmid-DNA nach kleinem sowie großem Maßstab, v.a. bei Ligations- oder Mutageneseprodukten, wird die DNA zur Überprüfung an die Sequenzierfirmen GATC Biotech oder SeqLab geschickt. Nach Anweisungen auf der entsprechenden Homepage werden die Primer bestellt und bestimmte Mengen an Plasmid-DNA versendet. Die sequenzierte DNA kann anschließend mit den per Clone Manager entworfenen Zielsequenzen im *Multiple Sequence Alignment Tool* Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) abgeglichen werden.

2.2.4.3 Elektrophorese

2.2.4.3.1 Analytische Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese dient der Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe in einem elektrischen Feld, wobei die kleinen negativ geladenen Fragmente schneller durch das Netz aus Agarose zum Pluspol wandern als die großen Fragmente. Durch das Mitführen

eines Größenstandards kann sowohl die Größe als auch ggf. die Menge an Nukleinsäure abgeschätzt werden.

Je nach Fragmentgröße werden 1–2 %-ige (w/v) Agarosegele mit 50 ml 1 x TAE-Puffer gelöst und in eine Gelkammer gegossen. Der Kamm wird in die noch flüssige Lösung in die entsprechende Halterung eingesetzt und erst nach Festwerden des Gels sowie Auffüllen des Tanks mit 1 x TAE-Puffer gezogen. Die DNA- oder RNA-Probe wird 5:1 mit Ladepuffer gemischt und in die Geltaschen geladen. Zudem dient der *HyperLadder I* (Bioline) mit seiner Bandbreite von 200–10.000 bp als Größenstandard für die DNA. Als Vergleichsstandard für RNA wird der *Low Range ssRNA Ladder* (NEB) eingesetzt mit einer Bandbreite von 50–1.000 bp. Dieser muss zuvor für 10 min bei 70 °C erhitzt und auf Eis wieder abgekühlt werden.

Nach dem Beladen wird das Gel an ein elektrisches Feld angelegt und die Proben bei 120 V und 300 mA im Gel aufgetrennt. Dabei werden das Bromphenolblau und das Xylencyanol als Bestandteile des Probenpuffers zur Abschätzung der Bandenlaufweite genutzt und die Elektrophorese entsprechend beendet. Um die einzelnen Banden sichtbar zu machen wird das Gel für 10–30 min in einer Ethidiumbromidlösung (2 µg/ml; 1:10.000 in 1 x TAE) inkubiert. Das Ethidiumbromid interkaliert in die Nukleinsäure und kann dann durch UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) sichtbar gemacht und so die DNA anschließend photographisch dokumentiert werden.

2.2.4.3.2 Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese zur Auftrennung von RNA

Zur besseren Analyse und Auftrennung von RNA werden 4–6 %-ige denaturierende Polyacrylamidgele verwendet. Die Elektrophorese läuft dabei unter denaturierenden Bedingungen, d.h. durch Zugabe von 7 M Harnsäure zur Polyacrylamidlösung, ab. So liegt die RNA im Gel zum größten Teil linear vor und kann dadurch besser anhand der Größe identifiziert werden. Der Laufpuffer bei dieser Methode ist 1 x TBE. Die Probe wird 1:1 bis 1:4 mit FA-Puffer gemischt und in die Geltaschen geladen oder vorher für 5–10 min bei 85 °C erhitzt, um eine bessere Denaturierung im Gel zu gewährleisten. Wie bei der Agarosegel-Elektrophorese (Kapitel 2.2.4.3.1) wird auch hier eine Spannung von 100–150 V angelegt. Je nach Größe der RNA wird die Elektrophorese-Laufzeit anhand der Bromphenolblau- oder Xylencyanol-Lauffront abgeschätzt. Die Banden werden ebenfalls über Ethidiumbromid mittels UV-Licht sichtbar gemacht (Kapitel 2.2.4.3.1).

Zur Bestimmung der Inkorporationsrate von radioaktiv markierten Nukleotiden und der produzierten Menge an radioaktiv markierter RNA nach *in vitro*-Transkription (Kapitel 2.2.3.1.3) wird die Elektrophorese beendet, sobald der Bromphenolmarker die Mitte des Gels erreicht hat. Nur dadurch wird gewährleistet, dass sich die freien Nukleotide noch

im Gel befinden und nach Autoradiographie (Kapitel 2.2.8) das Verhältnis des Einbaus radioaktiver Nukleotide in die RNA und nicht eingebauter Nukleotide abgeschätzt werden kann.

2.2.5 Zellkultur-Methoden

2.2.5.1 Verwendete Zelllinien

HeLa-Zellen sind menschliche Epithelzellen aus dem Zervix-Tumorgewebe. Diese Zellen zeichnen sich durch ihre unbegrenzte Zellteilungsfähigkeit aus und zählen daher zu den eukaryotischen Standard-Untersuchungssystemen für molekularbiologische und biochemische Methoden. Zudem enthalten sie keine endogene miR-122, wodurch ein direkter Effekt der miR-122 auf die Ziel-RNAs durch Zugabe exogener miR-Duplexe nachgewiesen werden kann.

Die HuH-7.5-Zellen sind spezielle humane Leberkarzinom-Zellen. Sie stammen von HuH-7 Zellen ab, die zuvor stabil mit einem HCV-Replikon-System transfiziert und anschließend durch Interferon-Behandlung geheilt wurden ^[207]. Durch die daraus resultierenden Mutationen im Zellgenom kann HCV in HuH-7.5-Zellen in Kultur besser vermehrt werden als in HuH-7-Zellen. Die HuH-7.5-Zelllinie ist daher für die Untersuchung der Replikation von HCV in Zellen, die Hepatozyten möglichst ähnlich sein sollen, besser geeignet als HuH-7.

2.2.5.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die Zelllinien, welche sich zur Aufbewahrung in Flüssigstickstoff befinden, werden zum Auftauen aus dem Stickstofftank in ein 37 °C-warmes Wasserbad überführt. Sobald die Zellen aufgetaut sind, werden sie in einer sterilen Zellkulturflasche (25 cm²) in 5 ml vorgewärmtem DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles Medium*) angezogen. Dem DMEM werden vor Gebrauch 10 % fötales Rinderserum (FBS) sowie 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) zugegeben (DMEM^{+/+}). Dieses Medium wird, sofern nicht anders beschrieben, bei allen Zellkulturmethoden verwendet.

Die Zellen werden bei den optimalen Wachstumsbedingungen von 37 °C und 5 % CO₂ für einige Stunden inkubiert, bis sie sich zu einer adhärennten Einzelschicht abgesetzt haben. Um die beim Gefriervorgang gestorbenen Zellen und das restliche DMSO des Kryomediums zu entfernen, wird das alte Medium durch frisches ersetzt. Sobald die Zellen 80–90 % des Bodens der Kulturflasche bedeckt haben, können diese passagiert oder für Transfektionen ausgesät werden.

Nach 1–5 Passagen können erneut Aliquots eingefroren und in Flüssigstickstoff längerfristig gelagert werden. Dies dient dem Erhalt der Zelllinie, da sich mit zunehmenden Passagen die Eigenschaften der Zellen, wie Transfektionseffizienz und Wachstumsrate, verändern.

Die Zellen werden bei einer Konfluenz von 80–90 % mit PBS gewaschen und dann abgelöst (Kapitel 2.2.5.3). Das Trypsin wird hierbei durch das Kryomedium (70 % DMEM^{-/-}, 20 % FBS und 10 % DMSO) inaktiviert. Die Zellsuspension wird in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 4 °C und 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen mit ca. 10 ml Kryomedium auf eine Endkonzentration von 2–4 x 10⁶ Zellen/ml gebracht. Je 1 ml Zellsuspension wird in vorgekühlte Kryoröhrchen überführt und im Isopropanol-Tank bei - 80 °C eingefroren. Durch den Tank können die Zellen langsam (1 °C/h) abkühlen, sodass diese den Vorgang möglichst unbeschadet überleben. Am nächsten Tag werden die Zellen in Flüssigstickstoff überführt und aufbewahrt. Nach einer Woche kann eine Probe aufgetaut und auf Vitalität überprüft werden.

2.2.5.3 Passagieren von adhärenenten eukaryotischen Zellen

Bei einer Konfluenz von 90 % werden die adhärenenten Zellen aufgeteilt, um ein konstantes Wachstum zu gewährleisten. Die Zellen befinden sich bis zu 95 % Konfluenz in der logarithmischen Phase ihres Wachstums. Eine zu hohe Zelldichte würde zum Ablösen der Zellen vom Kulturboden und somit zur Apoptose führen.

Alle 3–4 Tage (d) werden die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen und anschließend mit 0,5 % Trypsin-EDTA (3 ml für 75 cm², 5 ml für 175 cm²) für 5–10 min bei 37 °C vom Kulturboden abgelöst. Trypsin wird durch das im DMEM^{+/+} enthaltene FBS inaktiviert. Das Verhältnis von Trypsin zu DMEM^{+/+} sollte dabei 1:≤1 sein.

Nach Resuspension der Zellen in DMEM^{+/+} werden diese 1:10 für 3 d bzw. 1:20 für 4 d zusammen mit frischem Medium in eine Zellkulturflasche überführt.

2.2.5.4 Zählen von eukaryotischen Zellen mittels Neubauer Zählkammer

Für alle Transfektionsversuche werden die Zellen vor dem Aussäen mit einem Hämozytometer quantifiziert. Zunächst werden die Zellen trypsiniert (Kapitel 2.2.5.3), anschließend ein Aliquot 1:1 mit Trypanblau gemischt und zwischen Deckglas und Grundplatte der Neubauer Zählkammer pipettiert. Unter mikroskopischer Betrachtung können Zellen mit blauer Umrandung und ggf. komplett blau gefärbte Zellen beobachtet werden. Das Trypanblau bindet an Oberflächenproteine auf der Zellmembran. Ist diese perforiert kann der Farbstoff ins Zytosol gelangen. Durch das Färben können somit nicht

intakte Zellen vom Zählen ausgeschlossen werden, sodass lediglich die Anzahl komplett intakter Zellen berücksichtigt wird.

Die Zellen befinden sich auf der Grundplatte, die mit einer Strichmarkierung versehen ist (Abbildung 2.1). Zur Bestimmung der Zellzahl wird eine Fläche von je 1 mm^2 von 4 großen Eckquadraten ausgezählt. Vier von diesen großen Quadraten werden zur Mittelwertbestimmung gezählt. Dabei ist darauf zu achten, dass jedes Großquadrat allseitig 3-fache Grenzlinien aufweist, von denen die mittlere die maßgebliche Linie zur Festlegung des Grenzbereichs darstellt.

Nach Berechnung des Mittelwertes und der Multiplikation mit dem Kammerfaktor von 10.000 und der Verdünnung kann die Zellzahl/ml bestimmt werden.

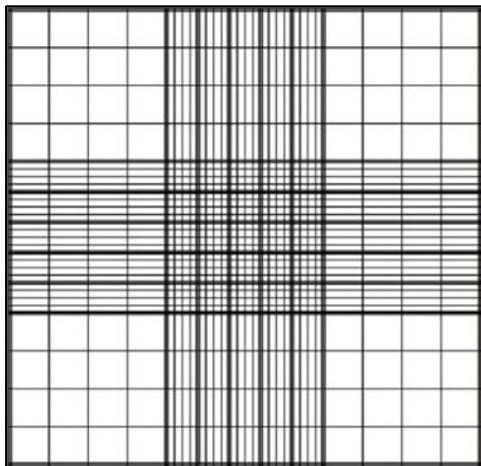


Abbildung 2.1: Aufteilung der Neubauer Zählkammer.

Das Hämozytometer besitzt eine Tiefe von 0,1 mm und kann in mehrere Quadrate unterteilt werden ($0,0025 \text{ mm}^2$ – 1 mm^2). Die Netzteilung dieser Kammer weist 4 mal 4 große Quadrate von je 1 mm^2 Fläche auf. Das Auszählen von vier dieser Eckquadrate dient der Mittelwertbestimmung. Durch anschließendes Multiplizieren mit 10.000 erhält man die Zellzahl/ml.

<http://zaehlkammer.de/deutsch/neubauer.improved.html>

2.2.5.5 Aussäen von adhärenenten eukaryotischen Zellen für Transfektionen

Für Transfektionen von HCV-Reporter-RNAs werden die HeLa- oder HuH-7.5-Zellen vom Kulturboden durch Trypsin abgelöst und anschließend in DMEM^{+/+} aufgenommen (Kapitel 2.2.5.3). Die Zellzahl wird, wie oben beschrieben, für Transfektionen mittels Lipofektion (Kapitel 2.2.5.6.1) bestimmt und die Zellen entsprechend ausgesät. Für co-Immunpräzipitationsversuche (Kapitel 2.2.6.1) werden $2,5 \times 10^6$ Zellen pro 10 cm-Zellkulturschale transferiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Für Elektroporationen (Kapitel 2.2.5.6.2) wird etwa eine 175 cm²-Zellkulturflasche pro zwei Proben umgesetzt, so dass die Zellen am Tag des Versuchs zu 80–90 % konfluent sind.

2.2.5.6 Transfektion von Reporter-RNAs

2.2.5.6.1 (Co-)Transfektion mittels Lipofektion

Die Transfektion dient dem Einbringen von RNA oder DNA in eukaryotische Zellen. Bei der Lipofektion binden die Nukleinsäuren an sogenannte liposomale Partikel, die dann über Endozytose in die Zelle aufgenommen werden. Hierfür wird das Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000 (L2000) verwendet.

Nach Angaben des Herstellers wird das L2000 in einem Verhältnis von 3:1 zu der zu transfizierenden RNA eingesetzt (μl L2000: μg RNA). Dafür wird die RNA in DMEM^{-/-} überführt; ebenso das Reagenz in einem separaten Ansatz. Die Menge von DMEM^{-/-} hängt dabei von der Größe der Zellkulturschale ab, auf der die Zellen zuvor ausgesät wurden. Für 10 cm-Schalen werden 500 μl Medium verwendet.

Der L2000/DMEM^{-/-}-Mix wird für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit in den RNA/DMEM^{-/-}-Mix überführt. Der so entstandene Mix wird nach dem Vortexen zur Komplexbildung für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

In der Zwischenzeit werden die einen Tag zuvor ausgesäten Zellen mit PBS gewaschen und mit DMEM ohne Zusätze bedeckt. Je nach Zellkulturschale werden hierfür unterschiedliche Volumina eingesetzt (z.B. 4 ml DMEM^{-/-} für eine 10 cm-Schale).

Nach Inkubation des Transfektionsansatzes wird dieser tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert. Die Zellen werden anschließend für 4–6 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bis die Komplexe durch Austausch des Mediums entfernt werden können.

Für die co-Immunpräzipitation werden 3 μg miRNAs mit 3 μg HCV-RNA mittels L2000 in HeLa-Zellen transfiziert (10 cm-Schale) und nach 6 h Inkubation ohne Mediumwechsel lysiert (Kapitel 2.2.6.1).

2.2.5.6.2 (Co-)Transfektion mittels Elektroporation

Die Elektroporation ist eine weitere Transfektionsmethode, bei der die eukaryotische Zellmembran durch einen elektrischen Puls vorübergehend permeabel gemacht wird. Sie dient in diesem Fall zur Analyse der Translationseffizienz und für RNA-Stabilitäts-Assays. Die Transfektionsmethode hat den Vorteil, dass die Nukleinsäure frei vorliegt und nicht in einem Komplex wie L2000. Sie wird somit nicht indirekt stabilisiert, was die Ergebnisse beeinflussen kann.

Die zuvor ausgesäten adhären Zellen werden am Tag der Transfektion abgelöst und in DMEM^{+/+} aufgenommen. Pro Transfektionsansatz werden 4×10^6 Zellen benötigt. Je nach Anzahl der Proben wird die entsprechende Menge an Zellsuspension in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 1000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet

wird anschließend mit 1 x PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen werden mit Zytomix auf eine Endkonzentration von 10^7 Zellen/ml eingestellt. Je 400 µl dieser Suspension werden mit dem RNA-Mix gemischt und in eine 4 mm-Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation von HeLa-Zellen erfolgt bei 240 V in 20 ms; bei HuH-7.5-Zellen werden 270 V eingestellt. Die behandelten Zellen werden direkt in 12 ml DMEM^{+/+} überführt. Wurden alle Proben elektroporiert, werden die Zellen resuspendiert und je 2 ml in eine Vertiefung einer 6-Well-Platte gegeben. Für verschiedene Zeitpunkte nach der Transfektion werden entsprechend mehr Ansätze einer Probe ausgesät und zu unterschiedlichen Zeitpunkten lysiert. Für manche Proben wird nur 1 ml der Suspension in eine Vertiefung gegeben, um ein Überwachsen und damit Absterben der Zellen nach einem Tag der Elektroporation zu verhindern. Die Zellen werden bis zur Lyse im Brutschrank inkubiert.

2.2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.2.6.1 Argonaute-Protein-spezifische RNA-co-Immunpräzipitation (Ago-co-IP)

Die Ago-Protein-spezifische RNA-co-Immunpräzipitation (co-IP) dient der Untersuchung der Interaktion von Ago-Proteinen mit bestimmten Sequenzen der HCV-RNA in Abhängigkeit von verschiedenen miRNAs. Dabei wird ein definiertes radioaktiv markiertes HCV-RNA-Fragment in HeLa-Zellen, mit oder ohne miRNA-Duplexe, transfiziert (Kapitel 2.2.5.6.1). Das zu analysierende Ago-Protein wird dabei über einen spezifischen an magnetische Kugeln (*Beads*) gekoppelten Antikörper aus dem Zelllysats isoliert. Sofern das HCV-RNA-Fragment mit dem Ago-Protein interagiert, wird die HCV-RNA co-präzipitiert und kann über Autoradiographie (Kapitel 2.2.8) detektiert werden.

In dieser Arbeit sollen die für die mutierten miRNA-Bindungsstellen entworfenen kompensierenden miRNAs getestet und ihrer Spezifität überprüft werden. Zudem soll die Menge an extrahierter HCV-RNA nach Bindung der einzelnen miRNAs quantifiziert werden. Es werden 50 µl Protein A bzw. 100 µl Protein G Magnetic Beads mit je 500 µl PBS gewaschen und in 1000 µl PBS resuspendiert. Durch die magnetische Eigenschaft kann die Flüssigkeit von den separierten *Beads* ohne Zentrifugation entfernt werden. Die vorbereiteten *Beads* werden mit den Antikörpern gemischt und bei 4 °C über Nacht rotiert. Je nach Antikörper variiert die einzusetzende Menge sowie der Typ der *Beads* (A oder G) (Tabelle 2.7).

Zur Transfektion (Kapitel 2.2.5.6.1) werden $2,5 \times 10^6$ HeLa-Zellen pro 10 cm-Zellkulturschale mit 3 µg radioaktiv markierter RNA und 0,1–3 µg microRNAs, je nach 5'-UTR Sequenz der HCV-RNA, transfiziert. Zum Nachweis der spezifischen Bindung werden äquimolare Mengen

locked nucleic acids (LNAs) co-transfiziert, welche an die entsprechende miR-Bindungsstelle binden und somit die Bindung der miRNA blockieren.

6 h nach der Transfektion werden die Zellen in der Schale zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und mit 1 ml co-IP Lysepuffer für 30 min bei 4 °C lysiert. Die Zellsuspensionen werden in ein Reaktionsgefäß überführt und für 30 min bei 16.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. In der Zwischenzeit werden die *Beads* einmal mit co-IP-Waschpuffer gewaschen und anschließend in 500 µl PBS aufgenommen. Nach dem Pelletieren der Zellreste wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 10 % des Lysates werden als Inputkontrolle bei 4 °C aufbewahrt, um nachweisen zu können, dass sich in jeder Probe gleich viel HCV-RNA befand. Die restlichen 90 % werden auf die Antikörper-gekoppelten *Beads* gegeben und für 3 h bei 4 °C rotiert. Die Proben werden kurz zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die *Beads* werden viermal mit 1 ml co-IP Waschpuffer gewaschen, in 1 ml PBS resuspendiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur späteren Kontrolle der Bindungseffizienz von Ago2 in den Proben (Kapitel 2.2.6.2, 2.2.6.3) werden 10 % der Suspension in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei - 20 °C aufbewahrt.

Der restliche Überstand der Proben wird verworfen und durch 250 µl Proteinase K Puffer und 10 µl Proteinase K (20 mg/ml) ersetzt. Die Inputkontrollen werden ebenfalls mit Enzym und Puffer versetzt. Die Proben werden bei 65 °C für 5 min in einem Schüttelinkubator inkubiert. Zudem werden 240 µl PBS zu 10 µl radioaktivem Transkript pipettiert, welches als HCV-RNA-Fragment transfiziert wurde und auf den Gelen als Längenmarker für die isolierten Fragmente dient. Alle Proben werden kurz zentrifugiert, mit 300 µl Phenol gemischt und bei 16.000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß mit 300 µl Chloroform überführt und erneut zentrifugiert. Die wässrige, obere Phase wird nochmals abgenommen und mit Ethanol über Nacht präzipitiert (Kapitel 2.2.2.3.4.3), wobei hier 1 µl GlycoBlue™ Coprecipitant (15 mg/mL) zum Fällern der RNA verwendet wird. Diese inerte Substanz besteht aus einem blauen Farbstoff, der an verzweigtes Glykogen gebunden ist. So wird das Pellet sichtbar und die Ausbeute durch das Präzipitieren auch kleiner Mengen RNA erhöht.

Das RNA-Pellet wird in 30 µl (co-IP) oder 100 µl (Input, Transkript) RNA-Probenpuffer gelöst. Dazu werden die Proben bei 50 °C und 800 rpm für 30 min in einem Schüttelinkubator inkubiert. Das gesamte Volumen der co-IP Proben sowie 30 µl der Input-Kontrollen werden auf getrennte 6 %-ige denaturierende Polyacrylamidgele (Kapitel 2.2.4.3.2) beladen. Das RNA-Transkript wird 1:500 bis 1:1000 in Probenpuffer verdünnt und 10 µl der Verdünnung auf das Probengel und 30 µl auf das Inputgel aufgetragen. Die co-präzipitierte HCV-RNA kann über Autoradiographie (Kapitel 2.2.8) detektiert und analysiert werden.

Tabelle 2.7: Menge der Antikörper für die anti-Ago-HCV-RNA co-IPs.

Antikörper	Menge pro 100 µl magnetischer Beads	Konzentration	Magnetische Beads
rat-anti-Ago2 clone 11A9	5 µl	~ 1,5 mg/ml	Protein G
rabbit-anti-eIF3a*	2 µl	2,5 mg/ml	Protein A
mouse-anti-FLAG	2 µl	~ 3,8 mg/ml	Protein G

* Es werden nur 50 µl Beads pro Probe verwendet.

2.2.6.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese dient zur Auftrennung von Proteinen und basiert auf dem von Laemmli beschriebenen Protokoll ^[208].

Zunächst werden die Proteine durch das Erhitzen bei 95 °C in einem SDS-Probenpuffer denaturiert, linearisiert und anschließend über ein Gel der Größe nach aufgetrennt. Die Proteineigenladung ist dabei durch die Negativladung des SDS vernachlässigbar, sodass das Verhältnis von Ladung zur Masse bei verschiedenen Proteinen annähernd gleich wird.

Das Gel besteht aus einem Sammel- und einem Trenngel, welche je nach Proteingröße unterschiedlich konzentriert sein können. Das Sammelgel hat einen pH-Wert von 6,8 und sorgt dafür, dass das Glycin im Laufpuffer in diesem Gel teilweise als Zwitterion vorliegt. Dieses läuft langsamer im Gel als die zeitgleich einwandernden Chlorid-Ionen (Cl⁻). Durch den Mangel an Ladungsträgern zwischen Cl⁻ und Glycin/Glycinat-Molekülen entsteht ein hoher Spannungsgradient zwischen den Laufronten. Langsam laufende Polypeptidketten werden in diesem Feld bis hin zum Trenngel beschleunigt, während kleinere Proteine durch die Leitionen (Cl⁻) abgebremst werden. Durch den erhöhten pH-Wert im Trenngel (pH 8,8) kommt es zu einer vollständigen Dissoziation des Glycins. Die erhöhte negative Nettoladung sorgt dafür, dass die Glycin-Ionen die Proteine überholen, wonach es durch die Maschen des Gels zu einer Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht kommt.

Die SDS-PAGE wird zum Nachweis der Bindungseffizienz der während der co-IP (Kapitel 2.2.6.1) isolierten Ago2-Proteine verwendet. Hierzu wird ein 10 %-iges Trenngel gegossen (Tabelle 2.8), welches etwa 2/3 des kompletten Gels ausmacht und bis zur vollständigen Polymerisation (ca. 20 min) mit 70% Ethanol überschichtet wird. Das Ethanol wird verworfen und der Rest mit Whatman® Zellulose-Papier entfernt. Das 5 %-ige Sammelgel wird auf das Trenngel gegossen (Tabelle 2.2.5.6.2.1) und mit einem Kamm für die Geltaschen versehen. Die Proben werden 1:4 mit 4 x SDS-Probenpuffer gemischt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Proben werden in die Geltaschen pipettiert und bei 100 V am Trenngel gesammelt. Durch Erhöhung der Spannung auf 120 V werden die Proteine aufgetrennt, bis

die Bromphenolblau-Front aus dem Gel läuft. Der Nachweis von Ago findet über Western Blot (Kapitel 2.2.6.3) statt.

Tabelle 2.8: Zusammensetzung des SDS-PAGE Trenn- und Sammelgels.

	Trenngel 10 %	Sammelgel 5 %
dH ₂ O	1,9 ml	1,4 ml
30 % Bisacrylamid (19:1)	1,7 ml	0,33 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	0,25 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1,3 ml	-
SDS 10 %	0,05 ml	0,02 ml
APS 10 %	0,05 ml	0,02 ml
TEMED	0,005 ml	0,002 ml
Gesamt	5 ml	2 ml

2.2.6.3 Western Blot

Der Western Blot dient dem Nachweis spezifischer Proteine auf einer Membran über die Bindung zweier Antikörper. Der erste Antikörper bindet spezifisch an das zu detektierende Protein. Der zweite Antikörper bindet an die Fc-Region des primären Antikörpers und ist kovalent an das Rezeptorenzym HRP (*Horseradish Peroxidase*) gebunden. HRP katalysiert die Oxidation eines Substrats unter Lichtemission. Diese Chemolumineszenzreaktion kann über Autoradiographie detektiert werden.

Zunächst müssen die in der SDS-PAGE (Kapitel 2.2.6.2) aufgetrennten Proteine über Elektro-Transfer auf eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF-) Membran übertragen werden. Hierfür wird die Membran auf die Größe des Gels (9 x 6 cm PVDF) zugeschnitten und 1 min in 100 % Methanol aktiviert. In derselben Größe wird 3MM Chromatographie-Papier (Whatman®) vorbereitet und je drei Blätter pro Gel mit den entsprechenden Elektrodenpuffern getränkt (Anodenpuffer I (API), Anodenpuffer II (APII), Kathodenpuffer (KP)).

Die Blot-Apparatur wird wie folgt zusammengesetzt: drei Lagen Whatman®-Papier aus dem API, drei Lagen Papier aus APII, aktivierte PVDF-Membran, SDS-PAGE Gel, drei Schichten Chromatographie-Papier aus KP. Dabei ist wichtig sicherzustellen, dass keine Luftblasen zwischen den Schichten zurückbleiben, denn in diesen Regionen können die Proteine nur reduziert transferiert werden.

Der Transfer erfolgt bei 43 mA pro Gel für 1,5 h. Anschließend wird die Membran in TBST mit 10 % (w/v) Trockenmilch (Blockierungspuffer) über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Der Puffer wird verworfen und erneut angesetzt. Nach Zugabe des Primärantikörpers (Tabelle 2.9) wird die Membran darin für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler inkubiert. Es wird dreimal mit TBST für je 10 min gewaschen. Nach 1 h Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Tabelle 2.9), ebenfalls im Blockierungspuffer unter ständigem Taumeln, wird nochmals dreimal gewaschen. Danach wird zweimal mit TBS gewaschen.

Tabelle 2.9: Western Blot Antikörper und ihre Verdünnungen.

	Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Primär	rat-anti-Ago2 clone 11A9	Sigma Aldrich	1:2.000
Sekundär	goat-anti-rat POD, light chain specific	Jackson ImmunoResearch	1:20.000

Das *SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific) wird nach Anweisungen des Herstellers auf die Membran gegeben. Dafür wird die Membran auf eine zugeschnittene, offene Plastikfolie gelegt und mit 1 ml Substratlösung versehen. Nach Zuklappen der Folie läuft die Reaktion für 5 min unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur. Durch Auflegen eines X-ray Films für einige Sekunden kann die Chemilumineszenz detektiert werden (Kapitel 2.2.8).

2.2.6.4 Nachweis der Expression von Reporter-Proteinen (Luciferase-Assay)

Der Luciferase-Assay dient dem Nachweis spezieller Reporter-Proteine (*Renilla*- oder *Firefly*-Luciferase), deren Aktivität nach Expression durch die Zugabe eines bestimmten Substrats über Lichtemission gemessen werden kann. Dadurch kann die Translationseffizienz des entsprechenden Reporterkonstrukts bestimmt werden. *Renilla*- (*Renilla reniformis*-) Luciferase katalysiert die Oxidation von Coelenterazine, während *Firefly*- (*Photinus pyralis*-) Luciferase die Oxidation von D-Luciferin in Anwesenheit von ATP, Mg^{2+} und Coenzym A katalysiert. Die gemessene Lichtemission der Luciferase-Reaktion ist dabei direkt proportional zur Reporteraktivität in der Probe, wodurch die Translationseffizienz quantifiziert werden kann.

In dieser Arbeit dient der Luciferase-Assay dem Nachweis der Translationseffizienz von HCV in Abhängigkeit der Bindung von miR-122 an die Zielsequenzen in der 5'-UTR. Die miRNA-Bindungsstellen wurden jeweils mutiert und können durch kompensierende miRNAs wieder

adressiert werden. Das RNA-Reporterkonstrukt enthält die für die Renilla-Luciferase (RLuc) kodierende Sequenz. Zudem wird eine Kontroll-Reporter-RNA co-transfiziert, um mögliche Messunterschiede aufgrund von variierenden Transfektionseffizienzen auszugleichen und somit eine Normalisierung zu ermöglichen. Dieses Konstrukt trägt das Firefly-Luciferase-(FLuc-) Gen.

Für den Assay werden 80–90% konfluente Zellen (HeLa) über Elektroporation (Kapitel 2.2.5.6.2) mit 4 µg HCV-Reporter-RNA, 2 µg Cap-FLuc-Reporter-RNA (Kapitel 2.2.3.1.4) und mit 2 µg miRNAs transfiziert. Nach 9 h Stunden werden die Zellen einmal mit 1 x PBS gewaschen und nach Anweisung des Herstellers (PJK) mit 500 µl Lysis-Juice für 15 min bei Raumtemperatur lysiert. Das Lysat wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Messung einige Tage bei - 20 °C aufbewahrt.

Zur Bestimmung der Reporter-Protein-Mengen werden je 20 µl Lysat in eine 96-well-Mikrotiterplatte überführt und mittels *Multimode reader* (Tecan) quantifiziert. Dafür werden die verschiedenen Substrate wie im *PJK Kit* beschrieben angesetzt. Zur Messung werden 90 µl des *PJK Renilla Juice® Luciferase* Substrats für RLuc bzw. des *PJK Beetle Juice®* für FLuc verwendet. Die Messung wird für 5 s und in Zwei-Sekunden-Abständen zwischen den Proben durchgeführt. Um unspezifische Hintergrundsignale von den Messwerten abziehen zu können, wird eine Probe ohne Reporter-RNA (Mock-Kontrolle) als Blindwert gemessen.

2.2.7 Biochemische Methoden zur Analyse von RNA

2.2.7.1 Electrophoretic Mobility Shift Assay

Der *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) ist eine auf Elektrophorese basierende Nachweismethode von Protein-DNA- oder Protein-RNA-Interaktionen. Dafür wird meist eine *in vitro*-Hybridisierungsreaktion einer Nukleinsäure (NA) mit einem oder mehreren Proteinen auf einem Agarose- oder Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Geschwindigkeit der Moleküle hängt dabei sowohl von der Größe als auch Ladung ab, seltener von ihrer Struktur. Durch das Mitführen einer Kontrollprobe aus einer Nukleinsäure ohne die Anwesenheit eines Proteins kann das verzögerte Laufverhalten (*Shift*) der Banden der Komplex-bildenden Proben beobachtet werden. Die NA-Proteinkomplexe sind größer und weniger mobil als die reine Nukleinsäure und befinden sich daher weiter oben im Gel. Sofern die Ausgangskonzentration und die Stöchiometrie der beteiligten Moleküle bekannt sind, kann die Dissoziationskonstante (K_d) des Proteins für die Zielsequenz bestimmt werden.

Die Methode soll daher zur Bestimmung der miR-122-Bindungsstärke an die HCV-5'-UTR verwendet werden. Dafür wurde die mutierte S1mS2m-HCV-IRES mit den kompensierenden

miRNAs *in vitro* separat und gemeinsam adressiert und auf einem Polyacrylamidgel analysiert. Das Protokoll für die RNA/RNA-Hybridisierung stammt aus einer Publikation von Mortimer und Doudna ^[206] und wurde für die vorliegende Arbeit abgewandelt. Die einzelnen Schritte werden im Folgenden näher erläutert.

2.2.7.1.1 Synthese der [α -³²P]-markierten Ziel-RNA

Die radioaktiv markierte HCV-RNA wird *in vitro* mit der T7 RNA-Polymerase synthetisiert (Kapitel 2.2.3.1.3). Dafür wird, wie bereits beschrieben, von der Plasmid-DNA pUC18-J6/JFH1-IRES_{mut}-S1-HDV_{rz} eine präparative PCR durchgeführt, um den gewünschten Sequenzabschnitt zu amplifizieren (Kapitel 2.2.2.1.2). Nach der *in vitro*-Transkription wird die RNA über Phenol/Chloroform gereinigt (Kapitel 2.2.2.3.4.2) und mit Ethanol präzipitiert (Kapitel 2.2.2.3.4.3). Zur Bestimmung der RNA-Konzentration (Kapitel 2.2.3.1.3) wird die RNA anschließend auf ein 6 %-iges Gel geladen (Kapitel 2.2.4.3.2) und nach Autoradiographie detektiert (Kapitel 2.2.8).

2.2.7.1.2 Hybridisierung der artifiziellen miRNAs an die HCV-RNA

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität von miR-122 an die HCV-5'-UTR wird eine konstante Menge an *in vitro*-transkribierter, radioaktiv markierter HCV-RNA mit steigenden Molmengen des artifiziellen miRNA-Führungsstrangs hybridisiert. Dazu werden zunächst 4 pmol des Transkripts für 5 min bei 65 °C erhitzt. Nach dem langsamen Abkühlen bei Raumtemperatur auf ca. 35 °C werden steigende molare Verhältnisse (0,5–14) des jeweils funktionellen miRNA-Einzelstrangs hinzu pipettiert. Als Kontrolle wird eine RNA-Probe ohne miRNA mitgeführt. Dem Reaktionsansatz wird Hybridisierungspuffer (Kapitel 2.1.10.8) hinzugefügt und damit auf ein Gesamtvolumen von 15 µl gebracht. Die Bindung der miRNA an die HCV-RNA erfolgt anschließend für 30 min bei 37 °C. Vor der Auftrennung der Proben auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel (Kapitel 2.2.7.1.3) werden zu jeder Probe 15 µl des 2-fach konzentrierten Gelladepuffers (Kapitel 2.1.10.8) pipettiert.

2.2.7.1.3 Detektion der RNA-Hybride

Zum Nachweis der Bildung von RNA/RNA-Komplexen werden die gesamten Volumina der hybridisierten Proben (Kapitel 2.2.7.1.2) auf ein 15 %-iges, nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel geladen (Kapitel 2.2.4.3.2). Dagegen enthält das Polyacrylamidgel nur 0,5-fach TBE und zusätzlich 6 mM Mg²⁺, zur Stabilisierung der Komplexe. Um die Proben möglichst intakt aufzutrennen, wird die Gelelektrophorese bei 40 V und 4 °C über Nacht

durchgeführt. Nach Fixierung der Proben und dem Trocknen der Gele werden die Banden der radioaktiv markierten RNA durch Autoradiographie detektiert (Kapitel 2.2.8).

2.2.7.2 Ribonuclease Protection Assay

Der *Ribonuclease Protection Assay* (RPA) ist eine sehr sensitive Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von spezifischen RNA-Molekülen bekannter Sequenz in einem heterogenen RNA-Extrakt. Dabei wird eine komplementäre *in vitro*-transkribierte und radioaktiv markierte RNA mit hoher spezifischer Aktivität mit der extrahierten RNA gemischt, mit dem Ziel, diese an die Ziel-RNA zu hybridisieren. Zu dem Hybridisierungsmix wird dann eine Ribonuklease gegeben, die spezifisch ungebundene einzelsträngige RNA zu kleinen Oligomeren oder einzelnen Nukleotiden abbaut. Der hybridisierte Anteil der radioaktiv markierten RNA bleibt vor dem Abbau geschützt und kann nach Entfernung der RNase mit Gel-Elektrophorese und Autoradiographie (Kapitel 2.2.8) sichtbar gemacht werden (Abbildung 2.2).

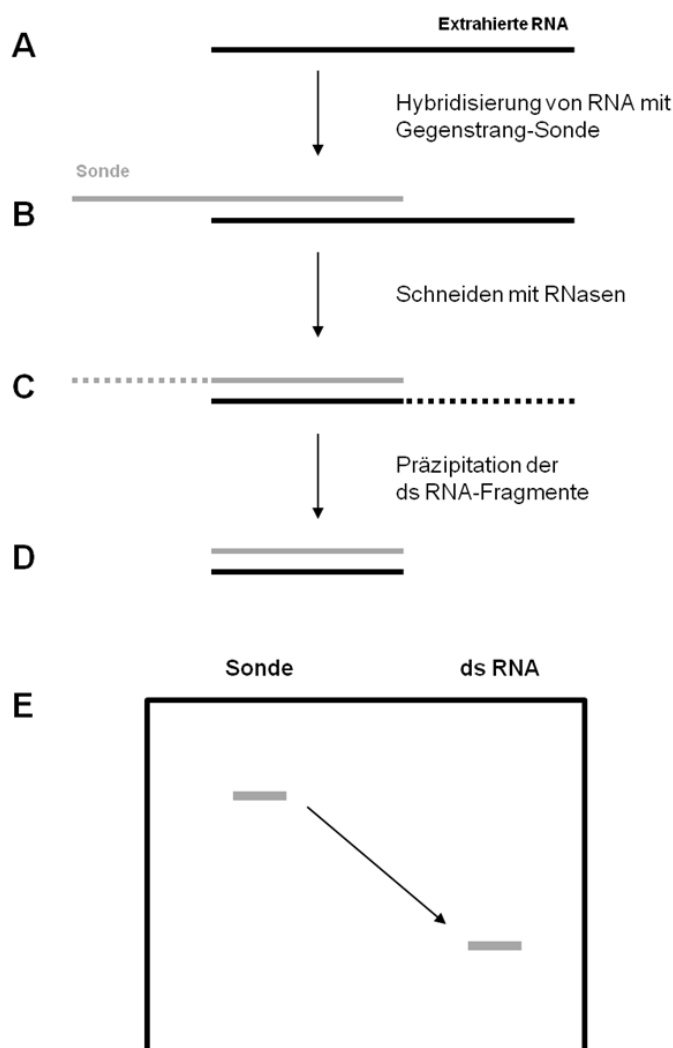


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Ablaufs eines RNase Protection Assays. (A) Die zuvor aus Zellen isolierte RNA (hier: HCV-RNA) wird an einen komplementären RNA-Einzelstrang hybridisiert (B). Der als Sonde bezeichnete Gegenstrang ist in diesem Fall radioaktiv markiert. Durch das Schneiden mit RNasen (RNase A/T1) werden nicht hybridisierende Bereiche degradiert (D), sodass nur die Duplexe geschützt zurück bleiben (D). Die Integrität der extrahierten RNA kann indirekt über den Nachweis der Sonde detektiert werden. Dafür wird die behandelte Probe (ds RNA) zusammen mit der unbehandelten Sonde auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel beladen (E) und in diesem Fall über Autoradiographie nachgewiesen. Die Intensität des radioaktiven Signals ist dabei direkt proportional zur Menge der spezifischen Ziel-RNA.

Wird die antisense-RNA im molaren Überschuss im Vergleich zur Ziel-RNA eingesetzt, so ist die resultierende Signalstärke direkt proportional zur Menge an komplementärer RNA im Zellextrakt. Durch die sehr präzise Auftrennung auf einem hoch konzentrierten denaturierenden Polyacrylamidgel (Kapitel 2.2.7.1.5) können die geschützten Fragmente hinsichtlich ihrer Länge überprüft werden.

In dieser Arbeit dient diese Methode zum einen der Quantifizierung von HCV-5'-UTR-RNA, welche mit oder ohne kompensierenden miRNAs adressiert wurde. Zum anderen sollen in Abhängigkeit von den miRNAs die Längen der entsprechenden Fragmente überprüft werden.

2.2.7.2.1 Synthese der [α -³²P]-markierten antisense-RNA

Die radioaktiv markierte, komplementäre (antisense-) RNA wird *in vitro* über die SP6-RNA-Polymerase synthetisiert (Kapitel 2.2.3.1.3). Dafür wird, wie bereits beschrieben, von der komplementären Plasmid-DNA eine präparative PCR durchgeführt, um den gewünschten Sequenzabschnitt zu amplifizieren (Kapitel 2.2.2.1.2). Nach der *in vitro*-Transkription wird die RNA präparativ über ein denaturierendes Polyacrylamidgel gereinigt (Kapitel 2.2.3.2.3). Entsprechend der Sequenzlängen wird hierfür ein 6 %-iges Gel für die anti-HCV-RNA verwendet, während die interne Kontrolle (anti-FLuc) auf einem 4 %-igen Gel aufgetrennt wird. Die Menge an hergestellter RNA wird geschätzt (Kapitel 2.2.3.1.3) und bei - 20 °C gelagert.

2.2.7.2.2 Präparation und Reinigung der Ziel-RNA

Die synthetisierte und gereinigte HCV-RNA (Kapitel 2.2.3.2.2) wird in HeLa- oder HuH-7.5-Zellen transfiziert (Kapitel 2.2.5.6.2). Dabei werden 4 µg Ziel-RNA und 2 µg miRNA elektroporiert. Zudem werden, als interne Transfektionskontrolle, 2 µg einer 5'-Cap FLuc-poly(A)-kodierenden RNA co-transfiziert. Nach 6 h, 9 h und 24 h werden die Zellen mit Trizol-Reagenz für 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Die Lysate werden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 200 µl Chloroform auf dem Vortexer gemischt. Die Proben werden bei 16.400 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Die sich in der oberen wässrigen Phase befindliche zelluläre RNA, einschließlich der HCV-RNA, wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diese wird durch Zugabe von 1 x Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat über Nacht bei - 20 °C präzipitiert. Die RNA wird durch Zentrifugation bei 16.400 rpm und 4 °C für 25 min pelletiert und zweimal mit 80 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wird in 50 µl Hybridisierungspuffer resuspendiert und die Konzentration mittels fluorometrischer Messung bestimmt (Kapitel 2.2.4.1).

2.2.7.2.3 Hybridisierung und RNase-Behandlung der Sonde und Ziel-RNA

Zur Hybridisierung der HCV-RNA mit der radioaktiv markierten antisense-RNA (Sonde) werden 1 µg der extrahierten zellulären RNA (Kapitel 2.2.7.1.2) mit 0,1 ng Sonde (Kapitel 2.2.3.1.3) in 30 µl Reaktionsvolumen (Hybridisierungspuffer ^[209]) gemischt. Als Höhenkontrolle für die spätere Auswertung auf den denaturierenden Polyacrylamidgelen werden 50 ng gereinigte RNA (Kapitel 2.2.3.1.2) und 1 ng der Sonde mitgeführt. Diese *in vitro*-Hybridisierung zeigt die maximale Größe der durch die radioaktive Probe geschützten RNA. Zudem werden zwei Ansätze pipettiert, in denen sich jeweils nur 1 ng der reinen radioaktiv markierten RNA befindet, um den Unterschied zwischen langer Sonde und der an die Ziel-RNA gebundenen Fragmente ermitteln zu können. Dies zeigt an, ob die RNase-Reaktion erfolgreich war und die resultierenden Fragmente die geschützte RNA darstellen.

Die RNAs werden zunächst bei 85 °C für 5 min denaturiert, kurz zentrifugiert und anschließend über Nacht bei 42 °C im Heizblock inkubiert. Für eine optimale Hybridisierung wird eine Inkubationszeit von mindestens 14 h empfohlen.

Zu den Reaktionsansätzen wird ein Mix aus RNase-Reaktionspuffer (300 µl) und RNase A/T1 (30 U, 12 µg) pro Probe pipettiert. In einem der Ansätze wird jedoch nur 300 µl RNase-Reaktionspuffer hinzugegeben (Negativkontrolle). Nach 75 min bei 30 °C werden 16,5 µl 10 % SDS dazu pipettiert (Endkonzentration 0,5 %), um die enzymatische Reaktion zu stoppen. Daraufhin wird ein Ansatz bestehend aus 1 µl tRNA (10 µg/µl), 11 µl CaCl₂ (30 mM) und 100 µg Proteinase K pro Probe angesetzt und zu den hybridisierten RNAs gegeben. Die RNasen werden für 1 h bei 37 °C inaktiviert. Nachfolgend werden die Nukleinsäuren mittels Phenol/Chloroform gereinigt (Kapitel 2.2.2.3.4.2) und in Anwesenheit von 1 µl tRNA (10 µg/µl) und 1 x Volumen von 100 % Ethanol präzipitiert. Nach zweimaligem Waschen mit 80 % Ethanol und anschließendem Trocknen werden die RNA-Pellets in je 10 µl FA-Puffer auf dem Schüttelinkubator gelöst (1 h, 41 °C, 850 rpm). Aufgrund der höheren Konzentrationen der eingesetzten Kontrollen (antisense-RNA +/- RNasen, antisense-RNA + Ziel-RNA) werden diese vor der Analyse auf dem Gel verdünnt. Die *in vitro*-hybridisierten RNAs werden 1:20 in FA-Puffer verdünnt, die anderen Proben 1:300.

Die resuspendierte RNA kann ggf. über einen längeren Zeitraum bei -20 °C gelagert werden.

2.2.7.2.4 Auftrennung und Detektion der geschützten Fragmente zur Quantifizierung

Die hybridisierten und gereinigten RNA Fragmente (Kapitel 2.2.7.1.3) werden bei 85 °C für 5–10 min denaturiert. Je 10 µl der verdünnten antisense-RNA-Kontrollen sowie je 5 µl der verdünnten RNA/Sonde-Kontrolle und restlichen Proben werden anschließend in die

Taschen eines denaturierenden Polyacrylamidgels (Kapitel 2.2.4.3.2) geladen (6 % für HCV-RNA, 4 % für FLuc-RNA; die Konzentration ist abhängig von der jeweiligen Fragmentgröße). Die RNAs werden für etwa 1 h bei 120 V aufgetrennt. Anschließend werden die Gele für 10 min fixiert und getrocknet (Kapitel 2.2.8). Die Gele mit den geschützten HCV-RNA-Fragmenten sowie mit den entsprechenden FLuc-Kontrollen werden zusammen auf einem *phosphor screen* je nach Signalstärke von 2 h bis hin zu mehreren Tagen exponiert. Durch geringe Expositionszeiten ist das Signal nicht gesättigt und kann zur Quantifizierung herangezogen werden.

2.2.7.2.5 Auftrennung und Detektion der geschützten Fragmente zur Qualifizierung

Zum Vergleich der geschützten Fragmentlängen in Abhängigkeit von der jeweiligen adressierten miRNA-Bindungsstelle in der 5'-UTR von HCV wird nur die Hälfte der für die kleinen Gele verwendeten Mengen dieser Proben nach Denaturierung (Kapitel 2.2.7.1.4) in die Taschen eines 12 %-igen und 40 cm langen Sequenziergels (Kapitel 2.2.4.3.2) beladen. Die RNAs werden über Nacht bei 800 V für 22 h aufgetrennt. Die Gele werden ebenfalls fixiert und getrocknet (Kapitel 2.2.8). Aufgrund der Größe werden dafür etwa 5 cm vom oberen Rand des Gels abgeschnitten.

Je nach Signalstärke werden die Gele 2–4 d exponiert. Befinden sich die Proben verschiedener Zeitpunkte auf einem Gel, werden zwei *phosphor screens* aufgelegt und die Bilder später entsprechend zusammengefügt.

2.2.8 Autoradiographie

Diese Methode dient zur Visualisierung, Analyse und Quantifizierung radioaktiv markierter RNA. Die Polyacrylamidgele (Kapitel 2.2.4.3.2), welche mit radioaktiv markierten *in vitro*-Transkripten (Kapitel 2.2.3.1.3) beladen wurden, werden mit Frischhaltefolie umschlossen und für 10 min auf Röntgenfilme (X-ray) bei Raumtemperatur exponiert (direkte Autoradiographie). Für geringe radioaktive Probenmengen (co-IP, RPA), bei denen die Gele länger exponiert werden müssen, werden die Gele zunächst für 15 min in 7.5 % Essigsäure und 5 % Ethanol fixiert. Nach Überführen auf 3MM Chromatographiepapier werden die Gele bei 80 °C für 2 h unter Vakuum getrocknet und anschließend, je nach Experiment, ein paar Stunden bis hin zu mehreren Tagen auf Phosphor-Filmen (*phosphor screens*) exponiert. Die Phosphor-Filme können über den *Cyclone Plus Phosphor Imager* digital erfasst und über die OptiQuant™ Software nachträglich ausgewertet werden.

3 Ergebnisse

3.1 Design einer mutierten HCV-5'-UTR mit separat adressierbaren miRNA-Bindungsstellen

In der HCV-5'-UTR befinden sich zwei miR-122-Erkennungssequenzen. Die erste Bindungsstelle (S1) befindet sich in der Nähe der ersten Haarnadelstruktur (I) und die Zweite (S2) vor der Domäne II. Die miR-122 bindet zusätzlich zu ihrer *seed*-Sequenz mit 3–4 nt, in Richtung ihres 3'-Endes, an die HCV-5'-UTR. Die Hybridisierung zwischen beiden RNA-Sequenzen ist unterbrochen und wird durch die Ausbildung einer Ausbuchtung (*bulge*) charakterisiert (Abbildung 3.1, A). Diese ungewöhnliche Bindung der miR-122 an die 5'-UTR der viralen RNA führt zur Stabilisierung des Genoms und stimuliert die Translation^[153; 194; 197], Replikation^[162] sowie Partikelproduktion^[200–203] von HCV. Es konnte bereits gezeigt werden, dass bei separater Adressierung der Bindungsstellen die S1 für die Partikelproduktion wichtiger ist als die S2^[194].

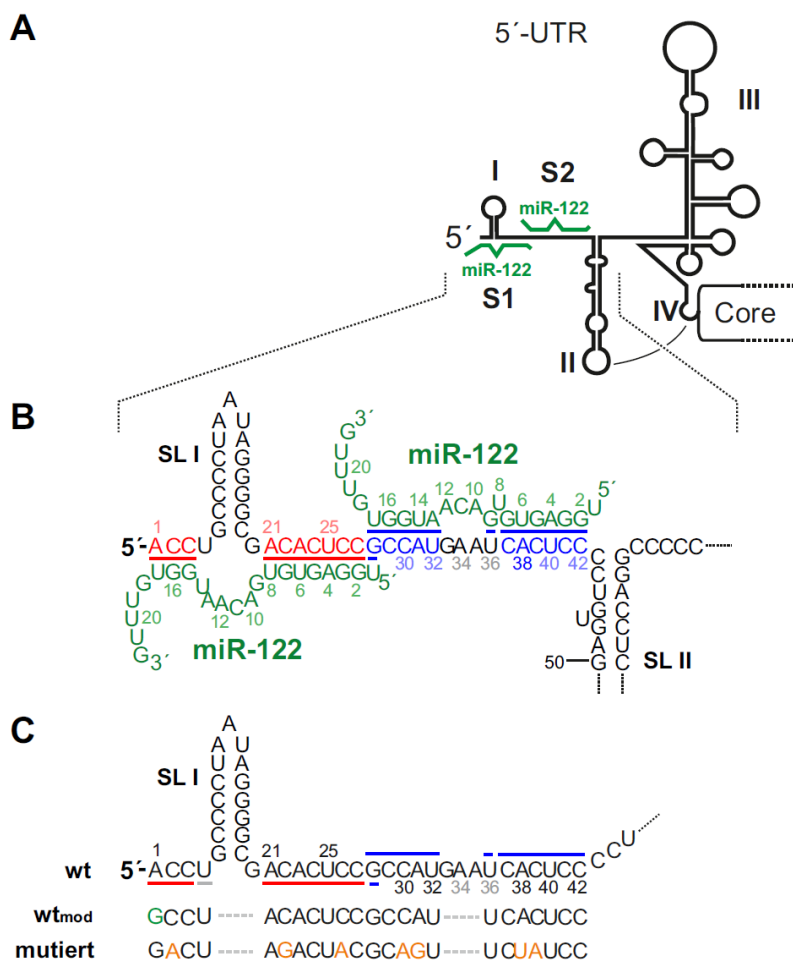


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Wildtyp- und mutierten HCV-5'-UTRs und die Bindung der miR-122. (A) Struktur der HCV-5'-UTR und die Lokalisation der miR-122-Bindungsstellen (grün), gebunden an S1 und S2. (B) Ausschnitt von Nukleotid 1–122 der 5'-UTR des Isolats J6 (Genotyp 2a). Die Bindung der miR-122 erfolgt an ihre Erkennungssequenzen um SLI (rot) und vor SLII (blau). (C) Überblick über die mutierten Nukleotide 1–42 der HCV-5'-UTR-Sequenz von J6. Das erste Nukleotid der Wildtyp- (wt) RNA wurde aufgrund von Sequenzanalysen zum Guanin (grünes G) modifiziert (wt_{mod}). Die Mutationen in den miR-122-Bindungsstellen sind orange markiert.

Es stellt sich die Frage, ob beide miRNA-Zielsequenzen unabhängig voneinander gebunden werden oder ob die Adressierung einer Sequenz die Bindung der miR-122 an die zweite Stelle induziert. Übernimmt dabei eine der beiden Erkennungssequenzen exklusiv individuelle Funktionen oder agieren beide Bindungsstellen einander ergänzend?

Zur Beantwortung der Fragen wurden die miR-122-Zielsequenzen in der 5'-UTR unterschiedlich mutiert, um so beide Bindungsstellen mit artifiziellen miRNAs separat adressieren und charakterisieren zu können. Dabei wurden Nukleotide in der Erkennungssequenz und in den weiter aufwärts befindlichen hybridisierenden Bereichen ausgetauscht (Abbildung 3.1, C). Das verwendete HCV-Genom entstammt einem chimären Konstrukt aus den Isolaten J6 und JFH-1 des Genotyps 2a. Es repliziert in Zellkultur besser als die jeweiligen reinen Isolate und produziert eine große Anzahl infektiöser Viren (HCVcc) ^[210]. Dieses HCV-Konstrukt sollte daher das bisher im Labor verwendete Con-1-Isolat (Genotyp 1b) ersetzen, um Untersuchungen in Zellkultur und Infektionsversuche zu optimieren.

Die HCV-5'-UTR ist unter allen bisher bekannten Isolaten hoch konserviert. Die Sequenz beginnt entweder mit dem Nukleotid Adenin (A) oder Guanin (G). Aufgrund der etwas stärkeren Konservierung von Guanin ^[35] und der erhöhten Stimulation der Transkription durch ein „G“ direkt hinter einer Promotorsequenz wurde für unsere Studien das erste Nukleotid der J6/JFH-1-Chimäre von „A“ zu „G“ ausgetauscht (Abbildung 3.1, C). Das genaue Vorgehen zur Herstellung der separat adressierbaren HCV-5'-UTR ist in Kapitel 3.1.2 beschrieben.

3.1.1 *In silico*-Strukturanalysen der modifizierten Wildtyp- und mutierten HCV-5'-UTR

Aufgrund der hohen Konservierung der HCV-5'-UTR-Struktur ^[35] wurden die *in silico*-Sekundärstrukturen der modifizierten Wildtyp- (wt_{mod}) und mutierten HCV-RNA miteinander verglichen. Dafür wurden die Nukleotide 1–117 der 5'-UTR von J6 in dem online zugänglichen Faltungsprogramm RNAfold analysiert (Abbildung 3.2). Es wurde das Turner-Modell von 2004 mit folgenden Parametern verwendet: *minimum free energy* (MFE) and *partition function, no dangling end energies* und *avoid isolated base pairs* bei 37 °C. Die Darstellung dieser Faltung erfolgte über das frei zugängliche Programm VARNAv3-93 ^[211]. Über den wählbaren Vienna-Farbcode wurde die Wahrscheinlichkeit für die Basenpaarung und die Einzelsträngigkeit entsprechend RNAfold kodiert.

Die miRNA-Erkennungssequenzen liegen bei beiden Sequenzen bezüglich der RNA-Sekundärstruktur wie in der originalen wt-RNA vor (vgl. Abbildung 3.1, A). Die Domänen SLI und SLII bilden dieselben Strukturen mit der gleichen Anzahl an Nukleotiden aus. Die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung des einzelsträngigen Bereichs zwischen SLI und SLII

ist jedoch bei der Doppelmutante erhöht und der SLII in seiner Struktur deutlich verstärkt (Abbildung 3.2).

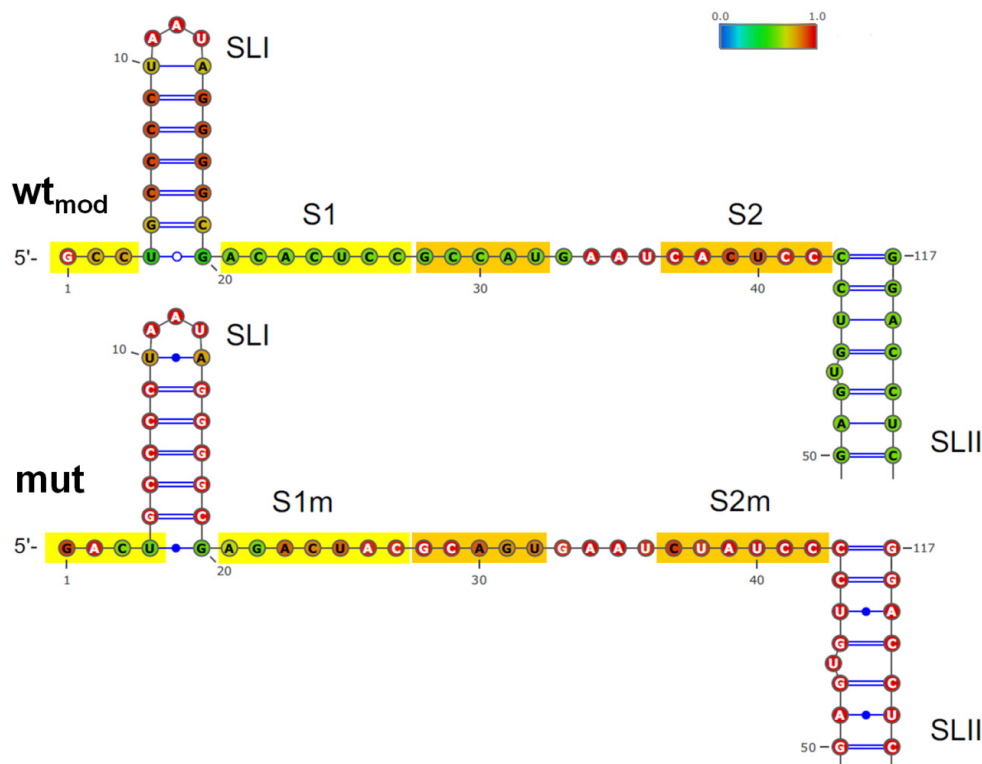


Abbildung 3.2: Faltung von Wildtyp- und mutierter HCV-5'-UTR. *In silico*-Faltung der Nukleotide 1–117 (inkl. SLII). In gelb und orange markiert sind die miRNA-Bindungsstellen (S1(m), S2(m)) in der modifizierten Wildtyp- (wt_{mod}) und mutierten HCV-5'-UTR. Die Farben zeigen in einzelsträngigen Bereichen die Wahrscheinlichkeit für die Einzelstrangbildung an, während in hybridisierenden Bereichen (SLI, SLII) die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung eines Doppelstrangs gegeben ist. Das Programm zur Faltung der RNA wurde online zur Verfügung gestellt (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>).

Aufgrund dieser Strukturanalysen wurde ein Modell der miRNA-Bindung an die entsprechenden 5'-UTR-Sequenzen angefertigt (Abbildung 3.3). Die Hybridisierung der miR-122-Varianten an die modifizierte HCV-5'-UTR erfolgt dabei über dieselben Nukleotide wie im Wildtyp (vgl. Abbildung 3.1 mit Abbildung 3.3). Für die mutierte Sequenz wurden entsprechend kompensierende miRNAs generiert, sodass die mutierten Nukleotide in der HCV-5'-UTR durch die miR-122m1 an der ersten Bindungsstelle (S1m) und durch die miR-122m2 an der zweiten Erkennungssequenz (S2m) gebunden werden können (Abbildung 3.3). Aufgrund des reduzierten GC-Gehaltes bei der Hybridisierung der miRNAs an die mutierten Zielsequenzen, im Vergleich zur wt_{mod} -5'-UTR, wurde das Nukleotid an Position 14 (P14) der miR-122m1 zusätzlich so modifiziert, dass es mit dem Nukleotid 4 der HCV-5'-UTR paaren kann. Das Nukleotid an P17 der miRNA wurde darüber hinaus von einem „U“ zu einem „C“ optimiert. Auch die Bindung von miR-122m2 an S2m ist um eine GC-

Paarung reduziert. Jedoch kann die Bindungsaffinität hier nicht durch zusätzlich bindende Nukleotide optimiert werden, da die *in silico*-Überprüfung der Strukturen verschiedener Mutationen nur diese Kombination mutierter Nukleotide zuließ, wenn die Sekundärstruktur erhalten bleiben sollte (nicht gezeigt). Darüber hinaus ist die Ausbildung einer *bulge* für die miRNA-Funktionalität an ihrer Zielsequenz essentiell und darf nicht verändert werden.

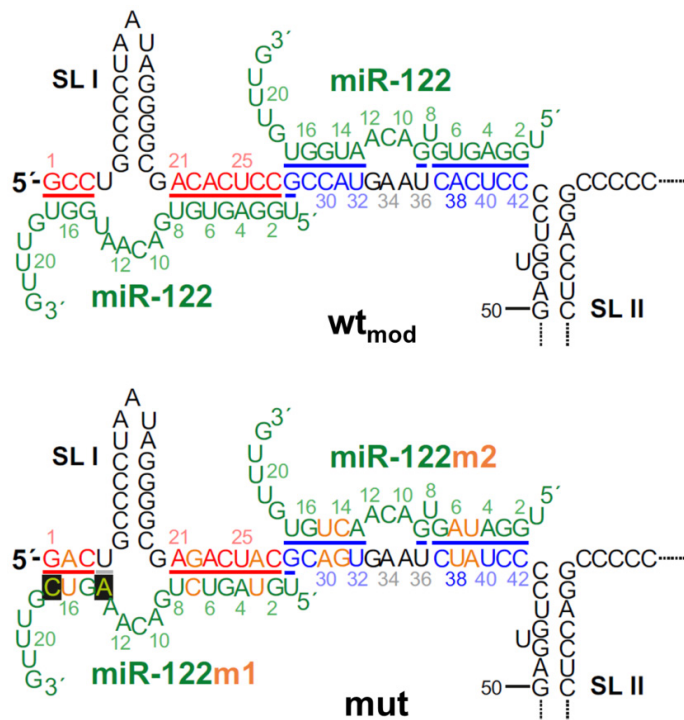


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Faltung von Wildtyp- und mutierter HCV-5'-UTR. Überblick über die Faltung der 5'-UTR (SLI–SLII) mit detaillierten Ausschnitten der miRNA-Bindungsstellen von modifizierter Wildtyp- (wt_{mod}) und mutierter (mut) RNA. Die mit der miR-122 (grün) paarenden Sequenzen der HCV-RNA sind in rot und blau dargestellt. Mutierte Nukleotide sind orange markiert. Unter den zur *seed*-Sequenz 3'-orientierten zusätzlich bindenden Nukleotiden (Position (P) 15-17) der miR-122 wurde die Bindung der kompensierenden miR-122m1 um ein Nukleotid (nt) erweitert (P14) und die Bindung eines anderen optimiert (P17) (schwarz hinterlegt).

3.1.2 Herstellung der mutierten HCV-5'-UTR

Für die Herstellung der mutierten 5'-UTR des Isolats J6 wurde zunächst die Wildtyp-Sequenz in ein bereits existierendes Konstrukt überführt, welches für verschiedene Studien verwendet werden sollte. Dieses Konstrukt (Anhang 6.1.2) enthält die 5'-UTR des Isolats Con-1 (Genotyp 1b), einschließlich des Start-Kodons in der Core-kodierenden Sequenz, um eine Translationsinitiation zu gewährleisten. Zur Transkription der HCV-RNA befindet sich ein T7-Promotor direkt vor der 5'-UTR.

Der Austausch der Con-1-5'-UTR durch die des Isolats J6 erfolgte über Amplifikation der Sequenz aus pFL-J6/JFH1 (Anhang 6.1.1). Es wurden Primer generiert, die an den 5'-UTR flankierenden Sequenzen im pFL-J6/JFH1-Plasmid binden können, aber zudem Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *HindIII* und *BamHI* trugen. Nach Amplifikation des entsprechenden DNA-Abschnitts über PCR und Restriktion der PCR-Produkte erfolgte die Ligation mit dem zuvor präparierten Vektor. Der Austausch wurde über Sequenzierung

bestätigt. Das neue Plasmid pUC18-J6/JFH1-IRES-S1-HDVrz (Anhang 6.1.3) wurde anschließend in die Mutagenese-Reaktion eingesetzt (Kapitel 2.2.2.2.1). Dafür wurden zwei zueinander komplementäre Primer gewählt, welche die entsprechenden Mutationen in den miR-122-Bindungsstellen (Abbildung 3.3) mitbrachten. Durch Verwendung einer Polymerase mit hoher Korrekturleserate wurden die Mutationen eingefügt und das gesamte Plasmid ohne zusätzliche unspezifische Mutationen amplifiziert. Nach DpnI-Verdau und damit dem Abbau der hemimethylierten Plasmid-DNA pUC18-J6/JFH1-IRES-S1-HDVrz wurde das mutierte Plasmid (pUC18-J6/JFH1-IRES_{mut}-S1-HDVrz) kloniert und per Sequenzierung überprüft. Das modifizierte Wildtyp-Konstrukt und die mutierte Plasmid-DNA wurden zunächst für die Charakterisierung der mutierten miRNA-Bindungsstellen in der anti-Ago2-RNA-co-Immunpräzipitation verwendet (Kapitel 3.2.1).

3.2 Charakterisierung der mutierten miR-122-Bindungsstellen in der HCV-5'-UTR

Die Untersuchung der mutierten und separat adressierbaren Erkennungssequenzen in der HCV-5'-UTR erforderte zunächst eine Überprüfung der Spezifität der Bindung der kompensierenden miRNAs (Abbildung 3.3) an ihre Zielsequenzen. Dies erfolgte über die anti-Ago2-RNA-co-Immunpräzipitation (co-IP). Mithilfe dieser Methode konnte bereits gezeigt werden, dass die miR-122 über Ago2 im Komplex an die 5'-UTR von HCV bindet ^[155]. Da Ago-Proteine für die Erkennung und Prozessierung von miRNA-Duplexen im miRNP-Komplex verantwortlich sind, können die kompensierenden miRNAs ebenfalls über co-Präzipitation mit Ago2 untersucht werden (Kapitel 3.2.1).

Erst nach einer Überprüfung der Bindung an die HCV-5'-UTR und die Untersuchung der Spezifität der separaten Adressierung war eine genauere Analyse der individuellen Funktionen beider Bindungsstellen möglich.

3.2.1 Anti-Ago2-RNA-co-IP zur Überprüfung der spezifischen Bindung der artifiziellen miRNAs an die mutierten Bindungsstellen in der HCV-5'-UTR

Zur Untersuchung der Bindungsspezifität der in der HCV-5'-UTR an die Mutationen kompensierend bindenden artifiziellen miRNAs (miR-122m1 und miR-122m2 (Abbildung 3.3)) wurde zunächst ein doppelsträngiger DNA-Abschnitt aus dem pUC18-J6/JFH1-IRES_{mut}-S1-HDVrz-Plasmid mittels PCR amplifiziert. Dieses Fragment diente als Template für die *in vitro*-Transkription einer 363 nt langen RNA bei 37 °C und in Anwesenheit einer T7-Polymerase. Die RNA enthielt neben der 5'-UTR das Start-Kodon der Core-kodierenden Sequenz für die IRES-Formation (IRES_{363nt}). Während der Transkriptionsreaktion wurde die RNA radioaktiv mit ³²P-UTP markiert (Kapitel 2.2.3.1.3).

Die wt_{mod}⁻ (IRES_{363nt} S1S2) und die mutierte (IRES_{363nt} S1mS2m) HCV-IRES-RNA wurden dann, zusammen mit miR-122-, miR-122m1-, miR-122m2- oder miR-124-Duplexen, in 80–90 % konfluente HeLa-Zellen transfiziert (Kapitel 2.2.5.6.1). Nach 6 h post-Transfektion wurden die Zellen lysiert. Es wurden 10 % des von Zelltrümmern befreiten Lysats für die Input-Kontrollen zurückbehalten. Die HCV-RNA im restlichen Lysat wurde anschließend über Ago2 3 h co-präzipitiert. Dafür wurde zuvor ein anti-Ago2-Antikörper an Protein G magnetische *Beads* gekoppelt. Darüber hinaus wurden zwei weitere Proben mit Antikörpern gegen eIF3 und FLAG co-präzipitiert. eIF3 bindet an die HCV-IRES unabhängig von miRNAs und wurde als Positivkontrolle für die co-IP-Reaktion mitgeführt. Das Polypeptid FLAG kommt natürlicherweise nicht in Zellen vor und wurde als Negativkontrolle eingeführt, um unspezifische Hintergrundsignale zu detektieren.

Nach dem Waschen wurden 10 % der *Beads* für die Western Blot-Analysen aufbewahrt. Die RNA wurde, zusammen mit dem radioaktiven Transkript (Input-RNA), nach Proteinase K-Behandlung über Phenol/Chloroform-Extraktion von den *Beads* separiert und mit Ethanol und GlycoBlue™ präzipitiert. Die Input-RNA wurde zur Überprüfung der Integrität der co-präzipitierten RNA herangezogen. Die Proben wurden über ein 6 %-iges Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend getrocknet und die radioaktive RNA über Autoradiographie detektiert.

Abbildung 3.4 zeigt die Ergebnisse der co-IP-Experimente mit wt_{mod}⁻ und mutierter HCV-RNA. Die Versuche zeigen eine miR-122-abhängige Präzipitation der wt_{mod}⁻-IRES (Abbildung 3.4, A4), während die Bindung an die HCV-RNA S1mS2m durch die Mutationen in den miR-122-Zielsequenzen unterbunden ist (Abbildung 3.4, B4). Wiederum lässt sich für die zu den Mutationen kompensierenden miRNAs eine Bande für die IRES_{363nt} S1mS2m nachweisen (Abbildung 3.4, B6, B7 und vgl. mit B4), was auf eine Bindung an die mutierten Erkennungssequenzen im Ago2-Kontext hindeutet. Eine Bindung von miR-122m1 und miR-122m2 kann für die wt_{mod}⁻-IRES nicht gezeigt werden (Abbildung 3.4, A6, A7).

Der Vergleich mit der miR-124 als Negativkontrolle bestätigt diese Sequenz-abhängige Bindung der miRNAs an ihre jeweiligen Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR (Abbildung 3.4, A5, B5). Die Input-Kontrollen (Abbildung 3.4, A und B, Input 2–7) zeigen darüber hinaus eine gleiche RNA-Abundanz in den einzelnen Proben, während die anti-Ago2 Western Blot-Proben (Abbildung 3.4, C, D) eine gleiche Effizienz der Ago2-Präzipitation aufweisen. Die detektierten Unterschiede in der Bindung der einzelnen miRNAs lassen sich demnach auf die spezifische Bindung an ihre jeweils homologen Sequenzen in der entsprechenden HCV-5'-UTR zurückführen. Die Bindung der miR-122 an die mutierte HCV-RNA ist durch die Mutationen entsprechend blockiert. Ebenso können die mutierten miRNAs nicht an die wt-Erkennungssequenzen binden.

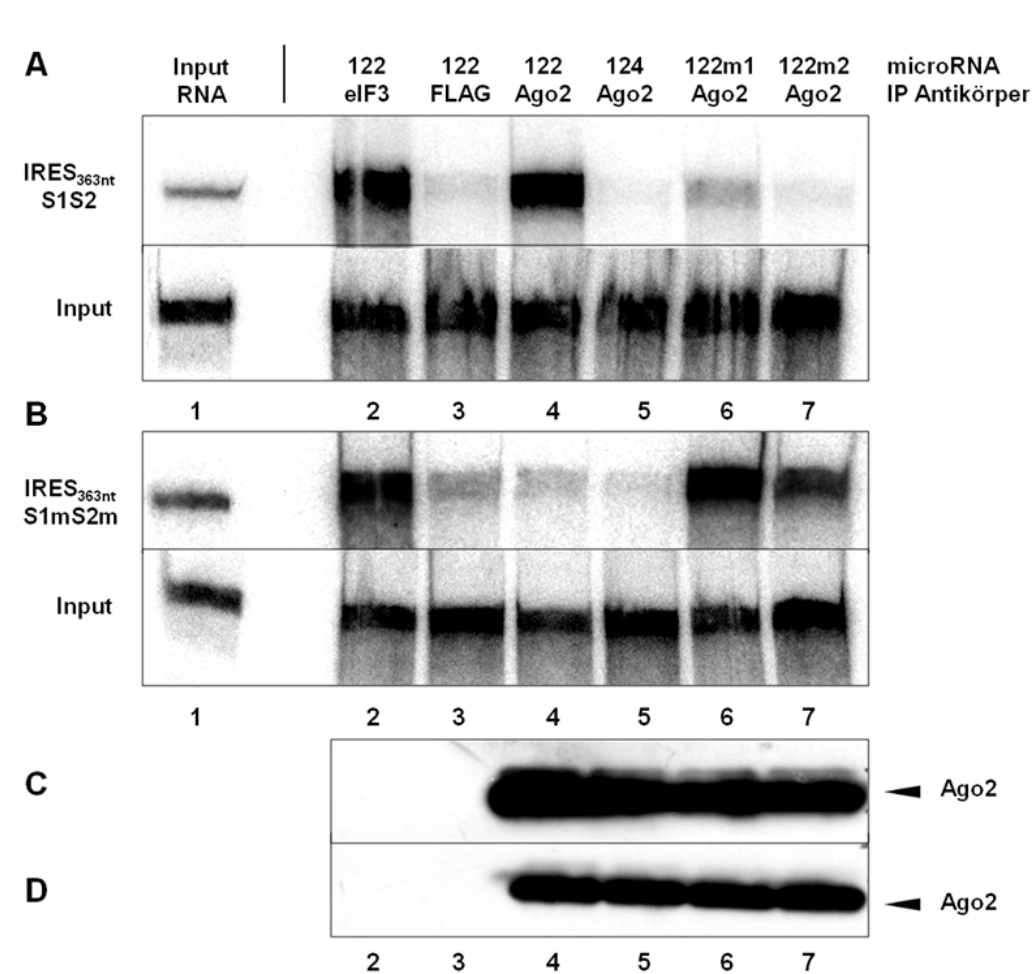


Abbildung 3.4: Anti-Ago2-RNA-co-IP mit Wildtyp- (S1S2) und mutierter (S1mS2m) HCV-IRES. HeLa-Zellen wurden mit 3 µg radioaktiv markierter HCV-RNA, mit einer Länge von 363 nt, zusammen mit 3 µg miRNA transfiziert. 6 h post-Transfektion wurden die Zellen lysiert, wovon 10 % als Input-Kontrolle verwendet wurde (Input; A, B). Das restliche Lysat wurde in der anti-Ago2-Immunpräzipitation verwendet. Als Positiv- bzw. Negativkontrolle dienten Antikörper gegen eIF3 (2) und FLAG (3), sowie die miR-124 (5). Nach dem Waschen der zur Präzipitation verwendeten magnetischen *Beads* wurden 10 % für Western Blot-Analysen verwendet (C, D). Die co-präzipitierte RNA wurde von den *Beads* gelöst und zusammen mit der Input-Kontrolle gereinigt und präzipitiert. Die RNA-Proben wurden auf 6 %-igen Polyacrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt (A, B). Gereinigtes Transkript wurde als Marker für die RNA-Integrität mitgeführt (1). Die Gele wurden getrocknet und die RNA über Autoradiographie detektiert.

Einen direkten Nachweis für die Bindung der miR-122m1 an die S1m und der miR-122m2 an die S2m liefert diese co-IP so jedoch noch nicht. Zur Untersuchung der spezifischen Adressierung der beiden miRNAs an die mutierten Bindungsstellen wurde daher eine co-IP durchgeführt, bei der zusätzlich zur HCV-RNA und den miRNAs sogenannte *locked nucleic acids* (LNA) co-transfiziert wurden. Diese LNAs sind kleine nicht-kodierende RNAs, die modifizierte Nukleotide tragen ^[212]. Es befindet sich eine extra Brücke zwischen dem zweiten Sauerstoff (2'-O) und dem vierten Kohlenstoff-Atom (4'-C) innerhalb der Pentose. Diese Verbindung blockiert (*locks*) die Ribose in ihrer Konformation. Diese Nukleotide befinden sich

für unsere Studien in DNA-Oligomeren und können mit der HCV-RNA hybridisieren. Diese Hybridisierung zwischen LNAs und Target-RNA-Sequenzen ist dabei deutlich stärker als zwischen zwei RNA-Molekülen ^[213], sodass eine Blockierung der miRNA-Bindungsstellen in der HCV-5'-UTR zu erwarten war. Die zur jeweiligen Mutation homologe LNA (LNA_{m1}, LNA_{m2}) soll die Bindung der miR-122m1 und miR-122m2 in ihre jeweilige mutierte Bindungsstelle spezifisch unterbinden.

Die co-IP wurde wie bereits zuvor beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse dieser co-IP sind in Abbildung 3.5 dargestellt.

Werden die mutierten miRNA-Erkennungssequenzen in der IRES_{363nt} S1mS2m mit der jeweiligen miR-122m1 und miR-122m2 adressiert, so ist erneut eine Ago2-abhängige Präzipitation der HCV-RNA zu erkennen (Abbildung 3.5, A5, C4). Wurde in einem gleichen Reaktionsansatz eine Zielsequenz-spezifische LNA co-transfiziert (LNA_{m1} mit miR-122m1, LNA_{m2} mit miR-122m2), so ist keine HCV-RNA mehr nachweisbar (Abbildung 3.5, A4, C6). Dies spricht für eine Blockierung der miRNA-Bindungsstellen durch die LNAs. Wird jedoch LNA_{m2} mit der mutierten HCV-RNA und miR-122m1 co-transfiziert, so kommt es zu einer Ago2-abhängigen Präzipitation der IRES_{363nt} S1mS2m (Abbildung 3.5, A3). Dasselbe Resultat konnte für LNA_{m1} und miR-122m2 gezeigt werden (Abbildung 3.5, C5). Diese Detektion spricht für eine tatsächlich ortsspezifische Hybridisierung der miRNAs an die jeweils mutierte Bindungsstelle in der HCV-5'-UTR.

Die Kontrollen weisen auch in diesem Versuch auf eine gleichmäßige Ago2-RNA-co-Präzipitation (Abbildung 3.5, B und D) und eine einheitliche RNA-Abundanz (Abbildung 3.5, A und C, Input 2–7) hin. Die detektierten Unterschiede zwischen den einzelnen Proben sind demnach auf die unterschiedliche Bindung durch die jeweilige miRNA bzw. LNA zurückzuführen.

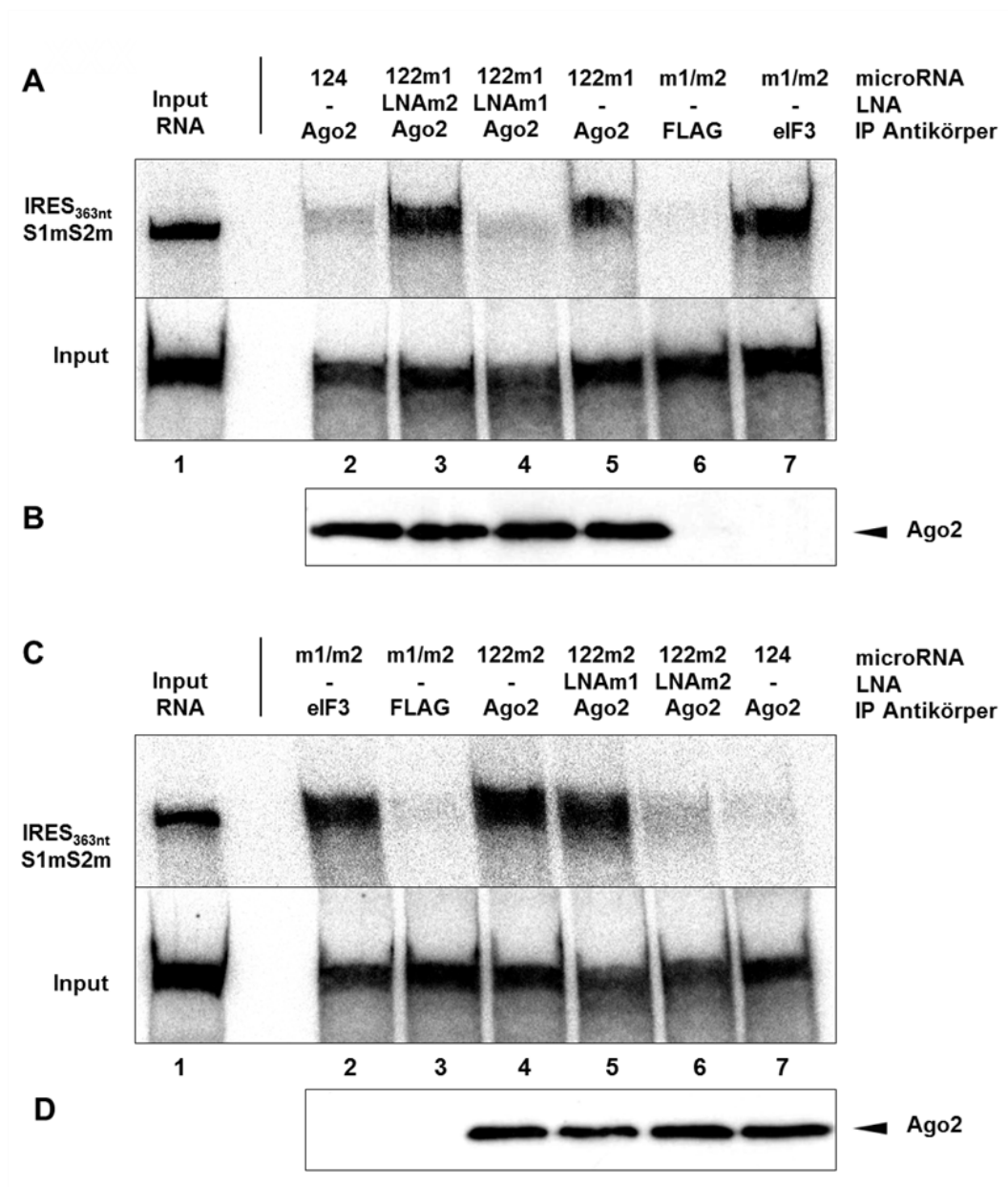


Abbildung 3.5: Anti-Ago2-RNA-co-IP mit mutierter HCV-5'-UTR (S1mS2m) zur Kontrolle der Spezifität der kompensierenden miRNAs. HeLa-Zellen wurden mit 3 µg radioaktiv markierter HCV-RNA, mit einer Länge von 363 nt, zusammen mit entweder miR-122m1, miR-122m2 oder miR-124 (Negativkontrolle) transfiziert. Zur Kontrolle der spezifischen miRNA-Bindung wurden zudem *locked nucleic acids* (LNAs) eingesetzt (A3 und A4; C5 und C6), die an die Zielsequenz binden und eine Hybridisierung mit der miRNA verhindern sollen. 6 h post-Transfektion wurden die Zellen lysiert, wovon 10 % als Input-Kontrolle verwendet wurde (Input; A, C). Das restliche Lysat wurde in der anti-Ago2 Immunpräzipitation verwendet. Als Positiv- bzw. Negativkontrolle dienten Antikörper gegen eIF3 (A6, C2) und FLAG (A7, C3). Nach dem Waschen der zur Präzipitation verwendeten magnetischen *Beads* wurden 10 % für Western Blot-Analysen verwendet (B, D). Die co-präzipitierte RNA wurde extrahiert und zusammen mit der Input-Kontrolle gereinigt und präzipitiert. Die RNA-Proben wurden auf 6 %-igen Polyacrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt (A, C). Gereinigtes Transkript wurde als Marker für die RNA-Integrität mitgeführt (1). Die Gele wurden getrocknet und die RNA über Autoradiographie detektiert.

Fazit: Mithilfe der co-IP konnte gezeigt werden, dass die Bindung der miR-122 an die mutierten Zielsequenzen der IRES_{363nt} S1mS2m blockiert ist. Ebenso werden diese Mutationen spezifisch von den kompensierenden miRNAs (miR-122m1, miR-122m2) gebunden und zeigen keine Hybridisierung an miR-122-komplementäre Sequenzen in der wt-5'-UTR. Die Bindung von miR-122m1 erfolgt dabei spezifisch an ihre Zielsequenz S1m und weist keine zusätzliche Bindung zu S2m auf. Gleiches gilt für die miR-122m2 und ihrer Erkennungssequenz S2m.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine separate Adressierung der miRNA-Bindungsstellen in der HCV-IRES möglich ist und dass die mutierte Sequenz in der 5'-UTR für weitere Studien verwendet werden kann.

3.2.1.1 Bestimmung der Bindungseffizienz der artifiziellen miRNAs an die separat adressierten Bindungsstellen

Bei der Auswertung der co-IPs zur Untersuchung der spezifischen Bindung der kompensierenden miRNAs an die mutierten Erkennungssequenzen in der HCV-5'-UTR wurde eine unterschiedliche Signalstärke der präzipitierten HCV-RNA-Banden identifiziert (Abbildung 3.4). Nach der Co-Transfektion der radioaktiv markierten IRES mit der zur S1m kompensierenden miR-122m1 ist eine stärkere Bande zu erkennen als nach der Adressierung der miR-122m2 an S2m (Abbildung 3.4, B6, B7). Dies deutet auf eine stärkere Bindung der miRNA an die erste Bindungsstelle der HCV-RNA hin. Von Interesse ist zudem, ob eine gemeinsame Adressierung der beiden miRNA-Erkennungssequenzen lediglich additiv erfolgt oder ob es sogar zu einer kooperativen Bindung kommt.

Um mögliche Unterschiede in der Affinität der Hybridisierung der kompensierenden miRNAs an die jeweilige Sequenz in der HCV-IRES zu untersuchen, wurde die Menge der co-transfizierten miR-122m1 und miR-122m2 reduziert. Dafür wurden zu gleichbleibenden Mengen der radioaktiven HCV-RNA (3 µg) verschiedene Mengen-Verhältnisse der miRNAs eingesetzt (1/3, 1/10 und 1/30). Bei der Reduktion der co-transfizierten miRNAs kommt es allerdings zu einer Veränderung im Verhältnis von kurzen zu langen RNA-Molekülen bei der Lipofektion. Befinden sich zu wenig kleine Moleküle im Reaktionsansatz, so kann es aufgrund einer besseren Komplexbildung zwischen kationischen Lipiden und den längeren anionischen Nukleinsäuren zu einer erhöhten Transfektionsrate der langen RNA-Fragmente kommen. Um dies zu verhindern wurde die Gesamtmenge der miRNAs im Transfektionsansatz mithilfe der miR-124 immer auf 3 µg gebracht, die keine Bindung zur HCV-RNA aufweist (Abbildung 3.4, A5, B5).

In Abbildung 3.6 ist exemplarisch eine co-IP mit 1 µg co-transfizierter miR-122m1 und/oder miR-122m2 gezeigt (A).

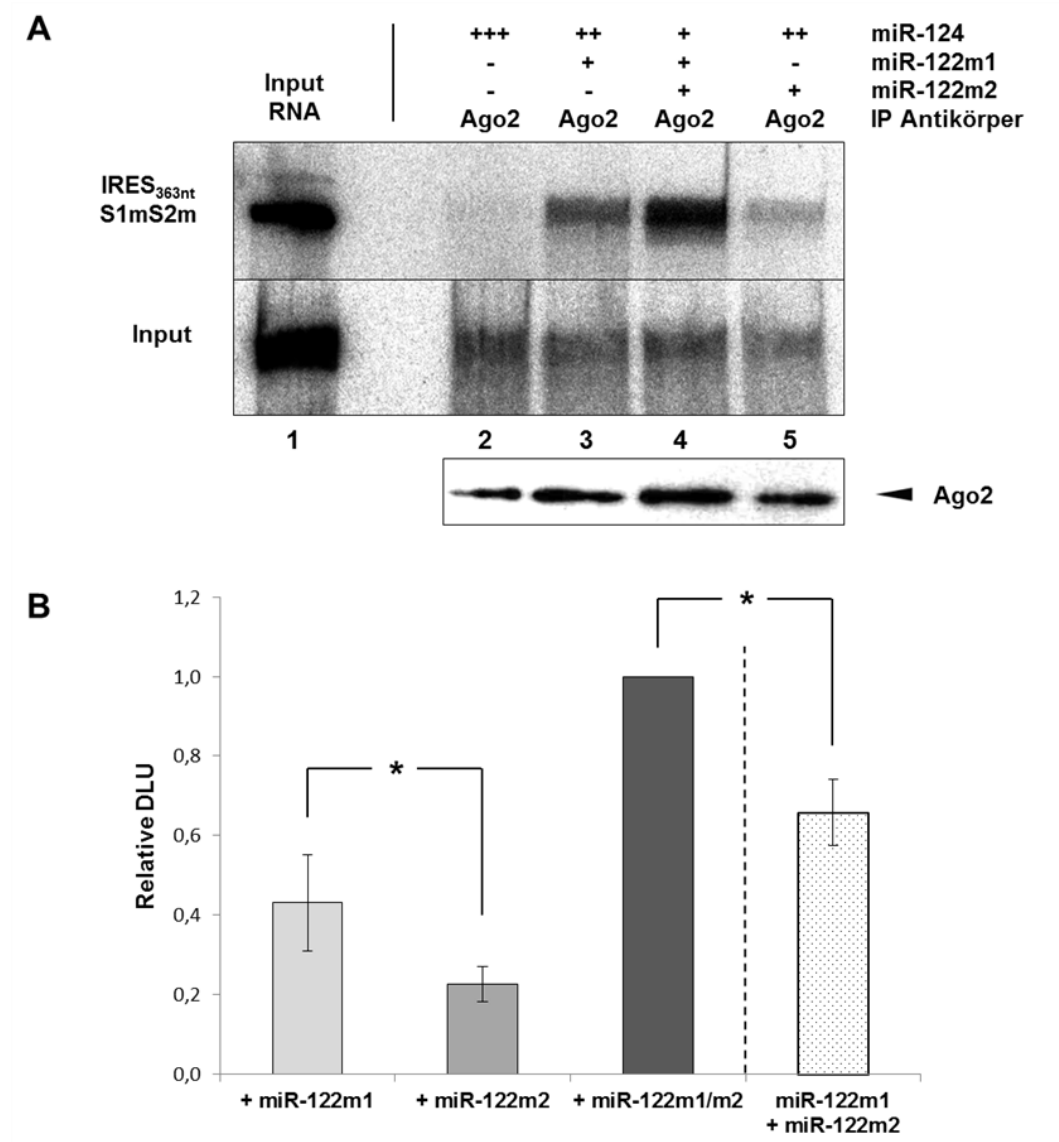


Abbildung 3.6: Effizienz der Bindung der mutierten miRNAs an S1m und S2m in der HCV-5'-UTR. (A) Anti-Ago2-RNA-co-IP mit radioaktiv markierter mutierter HCV-IRES (IRES_{363nt} S1mS2m) und 1 µg co-transfizierten miRNAs. Die miR-124 diente als Negativkontrolle und zum Auffüllen der miRNA-Menge bei der Transfektion auf 3 µg Total-miRNA. 6 h post-Transfektion wurden die Zellen lysiert: 10 % als Input-Kontrolle (Input), 90 % für die anti-Ago2 Immunpräzipitation. Nach dem Waschen der zur Präzipitation verwendeten magnetischen *Beads* wurden 10 % für Western Blot-Analysen verwendet (Ago2). Die co-präzipitierte RNA wurde extrahiert und zusammen mit der Input-Kontrolle gereinigt und präzipitiert. Die RNA-Proben wurden in 6 %-igen denaturierenden Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Das Transkript wurde als Marker für die RNA-Integrität mitgeführt (1). Die Gele wurden getrocknet und die RNA über Autoradiographie detektiert. +/+/++: 1 µg, 2 µg, 3 µg miRNA. (B) Quantitative Auswertung der Autoradiographie von drei co-IPs. Zur Bestimmung der Signalstärke wurden mit Hilfe der Software OptiQuantTM die *Digital Light Units* (DLU) berechnet. Die Werte der Proben wurden auf die Input-Kontrollen normalisiert. Die berechneten Signale für die Proben mit beiden kompensierenden miRNAs wurden anschließend auf „1“ gesetzt und die Werte der anderen Proben relativ dazu berechnet. Die Werte für miR-122m1 und miR-122m2 wurden addiert (miR-122m1+miR122m2) und mit der Referenzprobe verglichen (+ miR-122m1/m2). Der p-Wert wurde mittels studentischem t-Test (* = p < 0.05) ermittelt.

Wie bereits zuvor beobachtet, kann auch nach dieser co-IP im Vergleich zur Adressierung der S1m (Abbildung 3.6, A3) eine schwächere Bande in der Probe mit miR-122m2 nachgewiesen werden (Abbildung 3.6, A5). Die Filme der anderen co-IP-Proben mit geringeren eingesetzten miRNA-Mengen zeigten ein ähnliches Bild (nicht gezeigt). Aufgrund der homogenen Input- und Ago2-Western Blot-Kontrollen (Abbildung 3.6, A) ist dieser Unterschied auf eine diverse Affinität beider kompensierenden miRNAs zurückzuführen. Zudem wurde in der Probe mit miR-124 keine radioaktive HCV-RNA präzipitiert (Abbildung 3.6, A2), was zeigt, dass die miR-124 auch keinen Effekt auf die Signalstärke der anderen RNA-Banden hat.

Bei der Betrachtung der Probe mit miR-122m1 und miR-122m2 ist das Signal der präzipitierten radioaktiven RNA deutlich stärker (Abbildung 3.6, A4) als in den Proben mit einzeln adressierten Erkennungssequenzen (Abbildung 3.6, A3, A5). Dies konnte auch bei der Auswertung der co-IPs mit 0,3 µg und 0,1 µg miRNA beobachtet werden (nicht gezeigt). Ob dieses Signal der RNA-Bande jedoch stärker ist als die Summe der Einzelsignale der Proben mit nur jeweils einer adressierten miRNA-Bindungsstelle war zunächst nur zu vermuten. Zur Quantifizierung der Signalstärken sowohl nach gemeinsamer als auch einzelner Hybridisierung der miRNAs an die 5'-UTR wurden die Polyacrylamidgele aller co-IPs je nach Signalstärke bis zu 2 h exponiert. Mithilfe der Analysesoftware OptiQuant™ konnten die Bandenstärken auf den *Phosphorimager screens* quantifiziert werden. Die einzelnen Signale wurden dazu von Kästchen gleicher Fläche umrandet. Über die Software wurden dann die sogenannten *Digital Light Units* (DLU) berechnet, also die Anzahl an Pixeln innerhalb der bestimmten Fläche. Von den Werten für die Proben und Input-Kontrollen wurde zunächst der Hintergrund abgezogen und die DLU der einzelnen Proben auf die jeweilige Input-Kontrolle normalisiert.

Die errechneten Signalstärken jeder einzelnen präzipitierten HCV-RNA wurden anschließend innerhalb eines Datensets relativ zur Probe mit beiden kompensierenden miRNAs betrachtet. Replikate von co-IPs mit einer bestimmten Menge co-transfizierter miRNA wurden abschließend statistisch ausgewertet.

In Abbildung 3.6 ist die quantitative Auswertung dreier Replikate der Proben mit 1 µg miR-122m1 und/oder miR-122m2 gezeigt. Graphisch dargestellt sind die DLU der Proben mit nur einer miRNA bei der Lipofektion, relativ zu den Werten für die HCV-5'-UTR nach Hybridisierung mit beiden kompensierenden miRNAs (Abbildung 3.6, B). Darüber hinaus wurden die durchschnittlichen Bandenstärken, resultierend aus der Interaktion der HCV-IRES mit entweder miR-122m1 oder miR-122m2, addiert (miR-122m1 + miR-122m2) und mit der Referenzprobe (+ miR-122m1/m2) verglichen (Abbildung 3.6, B). Die quantitative Auswertung der einzelnen co-IPs zeigt eine höhere Präzipitationsrate in der anti-Ago2-co-IP durch die Bindung der miR-122m1 an die HCV-RNA als durch die Hybridisierung mit der

miR-122m2. Interessant ist zudem, dass die bestimmte Menge an extrahierter radioaktiver HCV-IRES nach Co-Transfektion mit beiden kompensierenden miRNAs 1,5-fach größer ist ($p < 0,5$) als die Summe der Mittelwerte für die einzelnen miRNAs. Die Auswertungen anderer co-IPs mit geringeren miRNA-Konzentrationen zeigen die gleiche Tendenz (nicht gezeigt).

Dies deutet erstmals auf eine kooperative Bindung der miRNAs an die Erkennungssequenzen in der HCV-5'-UTR hin. Unklar ist jedoch, welche der miRNA-Bindungsstellen zuerst gebunden wird und dadurch die Bindung der anderen miRNA stimulieren könnte.

Fazit: Durch die Quantifizierung der präzipitierten HCV-RNA in der co-IP konnte gezeigt werden, dass die zweite Bindungsstelle (S2m) deutlich schwächer von der kompensierenden miRNA gebunden wird als die erste Erkennungssequenz S1m von miR-122m1. Die berechnete Summe aus den jeweiligen Einzelwerten (miR-122m1 + miR-122m2) ist deutlich kleiner als die gemessene Signalstärke der radioaktiven RNA nach Co-Transfektion mit beiden kompensierenden miRNAs. Diese deutet erstmals auf eine kooperative Bindung beider miRNA/Ago2-Komplexe hin.

3.2.2 *Electromobility Shift Assay* zur Überprüfung der Bindungseigenschaften der jeweils kompensierenden miRNA

Die co-IP lieferte einen ersten Hinweis zur stärkeren Bindung von miR-122m1 im Ago2-Kontext an ihre Erkennungssequenz in der mutierten HCV-5'-UTR. Auch in *in vitro*-Studien konnte bereits gezeigt werden, dass zwei Kopien der miR-122 mit unterschiedlichen Affinitäten an die HCV-5'-UTR hybridisieren ^[206]. Die miRNA-Zielsequenz S2 wird in diesen Experimenten jedoch stärker gebunden als S1.

Um die Affinitäten der miR-122 zur viralen 5'-UTR zu untersuchen und mit den Ergebnissen der co-IP und den Ergebnissen von Mortimer und Doudna zu vergleichen, wurde ein *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) durchgeführt. Das Protokoll wurde jedoch etwas abgewandelt. In dieser Arbeit wurde radioaktiv markierte HCV-RNA (wt_{mod} und mut) mit der kompensierenden miRNA (miR-122, miR-122m1, miR-122m2) *in vitro* hybridisiert.

Zur Herstellung des radioaktiven Transkriptes wurde zunächst das entsprechende Fragment über PCR mit einem definierten Ende aus dem Plasmid pUC18-J6/JFH-1-IRES_(mut)-S1-HDVrz amplifiziert. Das DNA-Fragment trägt die T7-Promotor-Region zur *in vitro*-Transkription der nachfolgenden 117 nt der HCV-5'-UTR (inkl. SLII). Die radioaktive wt_{mod}-HCV-RNA wurde mit steigenden Mengen einzelsträngiger miR-122 in Anwesenheit von 5 mM Mg²⁺ inkubiert und die resultierenden Komplexe

abschließend auf 12 %-igen nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen mit 6 mM Mg^{2+} aufgetrennt.

In Abbildung 3.7 ist der EMSA nach der Bindung von miR-122 an die wt_{mod} -5'-UTR zu sehen. Das Transkript zeigt bei einer 0,5-fachen molaren Menge des aktiven miR-122-Einzelstrangs eine erste verzögerte Mobilität innerhalb des Gels. Nach Zugabe von gleich vielen Molekülen miR-122 zur HCV-RNA (1 MV) ist diese Verlagerung komplett erfolgt. Dies spricht dafür, dass die Hälfte der miRNA-Bindungsstellen besetzt wurde. Darüber hinaus konnten jedoch keine weiteren RNA-Banden, trotz erhöhter Mengen miRNA, beobachtet werden. Der erwartete zweite *Shift* bei doppelter Molekülanzahl von miR-122 zu HCV-RNA blieb aus.

Die Detektion nur eines *Shifts* lässt vermuten, dass nur eine Bindungsstelle von der miR-122 gebunden wird, während die Hybridisierung der anderen Erkennungssequenz an die miR-122 zu schwach ist, um diese beobachten zu können.

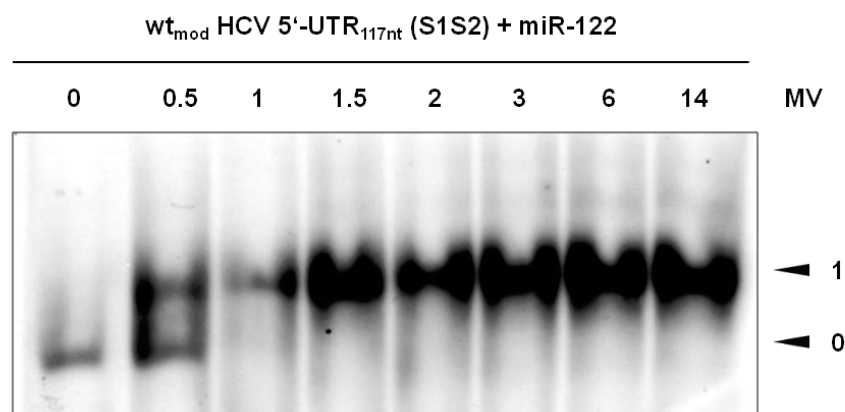


Abbildung 3.7: Electrophoretic Mobility Shift Assay der modifizierten Wildtyp-HCV-5'-UTR mit miR-122. Es wurden 4 pmol eines 117 nt langen radioaktiv markierten HCV-5'-UTR-Fragments (inkl. SLII) mit steigenden molaren Mengen einzelsträngiger miR-122 hybridisiert. Die Komplexe wurden anschließend über ein 12 %-iges nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Autoradiographie detektiert. Die Position der einzelnen Banden ist über Pfeile markiert. MV: Molares Verhältnis.

Zur Überprüfung der individuellen Bindungsstärken der miR-122 an die jeweilige Zielsequenz der HCV-RNA wurde ein EMSA mit der mutierten, radioaktiv markierten 5'-UTR und den kompensierenden miRNAs durchgeführt (Abbildung 3.8). Durch Analyse der einzelnen miRNA-Bindungseffizienz konnte gezeigt werden, dass nur die miR-122m2 an die HCV-RNA hybridisierte. Dies ist anhand des verzögerten Laufverhaltens des Transkriptes zu erkennen (Abbildung 3.8, + miR-122m2, 0,5 und 1 MV). Die Inkubation von miR-122m1 ergab hingegen keine Veränderung im Laufverhalten der radioaktiven RNA. In nur 1 von 6 Experimenten konnte ein *Shift* nach Zugabe von doppelt so vielen Molekülen miR-122m1 wie HCV-RNA beobachtet werden (nicht gezeigt). Nach Zugabe von miR-122m1 und miR-122m2 in einer gemeinsamen Hybridisierungsreaktion mit dem viralen RNA-Fragment konnte ebenfalls nur ein *Shift* beobachtet werden (Abbildung 3.8).

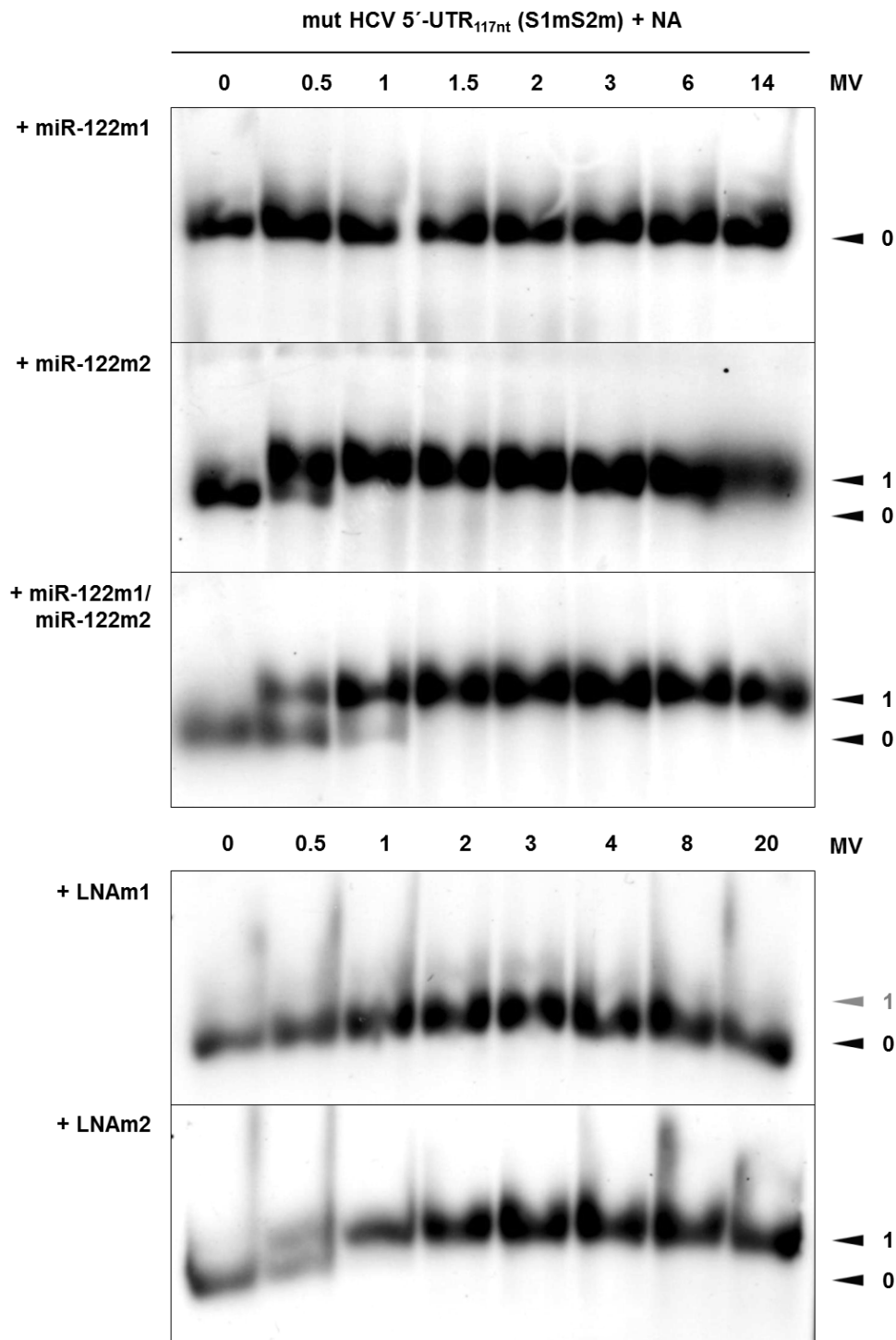


Abbildung 3.8: Electrophoretic Mobility Shift Assay der mutierten HCV-5'-UTR unter Zugabe verschiedener Nukleinsäuren (NA). Für den EMSA wurden 4 pmol eines mutierten, 117 nt langen radioaktiv markierten HCV-5'-UTR-Fragments (inkl. SLII) mit steigenden molaren Mengen einzelsträngiger miR-122m1, miR-122m2 oder *locked nucleic acids* (LNAm1, LNAm2) hybridisiert. Die Komplexe wurden anschließend über ein 12 %-iges nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Autoradiographie detektiert. Die Position der einzelnen Banden ist mit Pfeilen markiert. Die daneben befindliche arabische Ziffer gibt die Anzahl der Verlagerungen innerhalb eines Experimentes an. MV: Molares Verhältnis.

Diese Beobachtungen legen nahe, dass die S2m der S1mS2-5'-UTR *in vitro* stärker von der kompensierenden miRNA gebunden wird und dadurch stabiler ist als die Hybridisierung der miRNA mit S1m.

Die bereits in der co-IP verwendeten LNAs (Kapitel 3.2.1) zur Maskierung der miRNA-Bindungsstellen in der mutierten 5'-UTR wurden als zusätzliche Kontrollen im EMSA analysiert. Die Inkubation des radioaktiven Transkriptes mit steigenden Mengen LNAs (LNA_{m1}, LNA_{m2}) deutet auf eine Hybridisierung von LNA_{m2} an die virale RNA hin (Abbildung 3.8, + LNA_{m2}, 0,5 und 1 MV). Für LNA_{m1} kann hingegen nur eine sehr schwache Bindung mit dem Transkript vermutet werden. Diese ist jedoch erst nach Zugabe eines deutlichen Überschusses von LNA_{m1}-Molekülen im Vergleich zur HCV-RNA zu erkennen (Abbildung 3.8, + LNA_{m1}, 2–4 MV). Diese Bindungsstudien zeigen ähnliche Affinitäten von LNA_{m2} und miR-122m2 sowie von LNA_{m1} und miR-122m1 zu den entsprechenden Erkennungssequenzen in der HCV-5'-UTR.

Fazit: Die EMSAs zeigen, dass eine Bindung an die erste miRNA-Bindungsstelle in der HCV-5'-UTR nur sehr schwach nachzuweisen ist, während die zweite Erkennungssequenz der mutierten RNA deutlich stärker von der kompensierenden miRNA gebunden wird. Dies ist ebenso für die Bindung von miR-122 an S1 und S2 in der wt-RNA zu vermuten. Der ausbleibende zweite *Shift* bei der *in vitro*-Hybridisierung der miRNAs an ihre Zielsequenzen geht demnach auf eine fehlende Detektion eines ternären miRNA-5'-UTR-Komplexes zurück. Die Experimente mit den LNAs bestärken diese Vermutung. Die Bindung von LNA_{m1} an S1m ist jedoch, aufgrund der besseren Hybridisierung, eher zu erkennen als diejenige von miR-122m1 an S1m.

3.2.3 Luciferase-Assay zur Bestimmung der Translationsstimulation durch separat adressierte miRNA-Bindungsstellen

Für die HCV-RNA konnte ein Unterschied in der Stärke der Bindung der jeweils kompensierenden miRNA an ihre Zielsequenz in der 5'-UTR nachgewiesen werden (Kapitel 3.2.1.1, Kapitel 3.2.2). Darüber hinaus wurde erstmals eine kooperative Bindung an die miRNA-Zielsequenzen gezeigt (Kapitel 3.2.1.1). Mithilfe eines Reporter-Assays sollte anschließend überprüft werden, ob der kooperative Effekt ebenfalls bei der Stimulation der Translation zu beobachten und ob eine der beiden miRNA-Bindungsstellen stärker involviert ist.

Das in dieser Arbeit verwendete Reporter-Konstrukt (pUC18-J6/JFH1-IRES_(mut)-hRLuc-3'-UTR) enthält die bereits in vorherigen Studien verwendete 5'-UTR des chimären Virus

J6/JFH-1 (Subtyp 2a) und einen Teil der Core-kodierenden Sequenz (inkl. Start-Kodon) (Abbildung 3.9, A; Anhang 6.1.5).

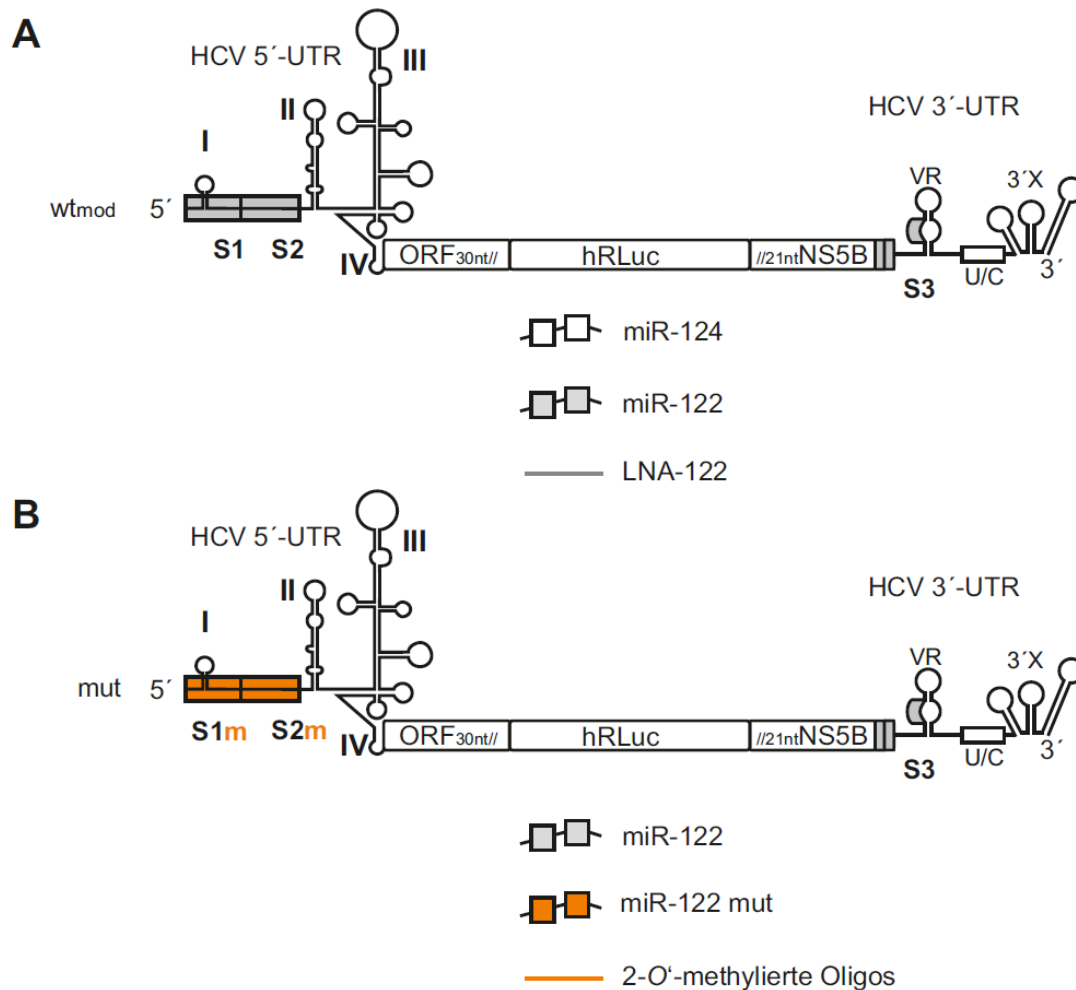


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung der HCV-Reporter-Konstrukte. Gezeigt sind zwei HCV-Reporter-Konstrukte mit der viralen 5'-UTR, dem Start-Kodon und 30 nt der Core-kodierenden Sequenz des *open reading frame* (ORF) sowie 21 nt vom 3'-Ende der viralen NS5B-kodierenden Region mit nachfolgender 3'-UTR. Im ORF befindet sich das humanisierte *Renilla Luciferase*- (hRLuc-) Gen. (A) Im Luciferase-Assay wird die modifizierte Wildtyp- (wt_{mod}-) 5'-UTR (S1S2) von HCV mit ektopischer miR-122 adressiert. Die miR-124 und das miR-122-blockierende *locked nucleic acid* (LNA-122) dienen als Kontrollen. (B) Im Luciferase-Assay wird die mutierte (mut) 5'-UTR (S1mS2m) von HCV mit kompensierenden miRNAs adressiert. Die miR-122 und die S1m-/S2m-blockierenden 2'-O-methylierten Oligonukleotide dienen als Kontrollen. S3: dritte miR-122-Bindungsstelle der HCV-3'-UTR.

Als Reporter-Gen wurde die kodierende Sequenz der humanisierten *Renilla-Luciferase* (hRLuc) im Leseraster eingesetzt. Dieses synthetische Gen wurde hinsichtlich des Kodon-Vorkommens in der Sequenz so optimiert, dass die Gen-Expression in eukaryotischen Zellen verbessert abläuft. An das 3'-Ende des Luciferase-Gens wurden 21 nt der 3'-terminalen NS5B-kodierenden Region und dahinter die 3'-UTR von HCV eingefügt. In der 3'-UTR befinden sich zur miR-122-*seed*-Sequenz komplementäre Nukleotide. Die zur

miR-122 komplementären Abschnitte bilden die dritte Bindungsstelle (S3) in nicht-kodierenden Bereichen von HCV und wurden u.a. für Studien der 3'-UTR in dieses Konstrukt eingefügt (Dissertation von N. Dünnes, 2016). Dabei paaren die in der miR-122 weiter 3'-orientierten Nukleotide mit dem Stopp-Kodon am Ende des NS5B-ORF und nachfolgenden Nukleotiden in der 3'-UTR. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit der 3'-UTR in HCV-Reporter-Konstrukten für die IRES-vermittelte Proteinsynthese entscheidend ist, aber die Adressierung der S3 mit miR-122 keinen stimulierenden Einfluss hat [44; 153]. Die 3'-UTR ist somit zwingend notwendig für die Untersuchung der miRNA-Bindungsstellen in der 5'-UTR, beeinflusst darüber hinaus aber nicht die miR-122-abhängigen Ergebnisse.

Die zwei miR-122-Erkennungssequenzen in der 5'-UTR wurden wie bereits beschrieben (Kapitel 3.1.2) mutagenisiert, um diese anschließend über kompensierende miRNAs separat adressieren zu können (Abbildung 3.9, B).

Das gewünschte DNA-Fragment wurde über PCR mit entsprechenden Primern amplifiziert, um ein definiertes 3'-Ende zu generieren und über die T7-Polymerase *in vitro*-transkribiert. Der T7-Promotor befindet sich im Reporter-Konstrukt direkt vor der HCV-5'-UTR (Anhang 6.1.5). Die *in vitro*-synthetisierte RNA wurde anschließend zusammen mit miRNAs in HeLa-Zellen transfiziert (Kapitel 2.2.5.6.2). Um den direkten Effekt der miRNAs auf die Stimulation der Translation nachzuweisen, wurden darüber hinaus miR-122- (LNA-122) bzw. S1m/S2m-blockierende 2'-O-methylierte DNA-Oligonukleotide co-transfiziert (Abbildung 3.9). Zur Normalisierung wurde eine Cap-Nukleotid tragende, polyadenylierte *Firefly-Luciferase*- (FLuc-) exprimierende RNA co-transfiziert (Anhang 6.1.4). Nach 9 h post-Elektroporation wurden die Zellen lysiert und die Reporter-Aktivitäten von hRLuc- und FLuc-Proteinen gemessen.

Durch das Mitführen einer Mock-Kontrolle, d.h. elektroporierte Zellen ohne transfizierte Nukleinsäuren, wurden unspezifische Hintergrundsignale ermittelt und von den gemessenen Reporter-Aktivitäten subtrahiert. Die resultierenden Werte für hRLuc der einzelnen Proben wurden auf die jeweilige FLuc-Kontrolle normiert. Die Werte wurden des Weiteren auf die Probe ohne Zugabe von miRNA (- miR) normiert. Die innerhalb eines Datensets normierten Werte verschiedener Replikate wurden gemittelt und zur Auswertung graphisch dargestellt (Abbildung 3.10, Abbildung 3.11).

In Abbildung 3.10 ist die miR-122-abhängige Stimulation der Translation durch die Bindung an die wt_{mod}-HCV-5'-UTR gezeigt. Im Vergleich zur Probe ohne ektopische miRNA (- miR) ist eine Steigerung der Proteinsynthese auf das 3-fache erfolgt (+ miR-122). Ein Abfangen der miR-122 durch Zugabe des LNA-122 bewirkt eine signifikante Reduktion der Reporter-Aktivität. Die Co-Transfektion mit miR-124, als Negativkontrolle, zeigte keine Auswirkung auf die virale Translationsstimulation.

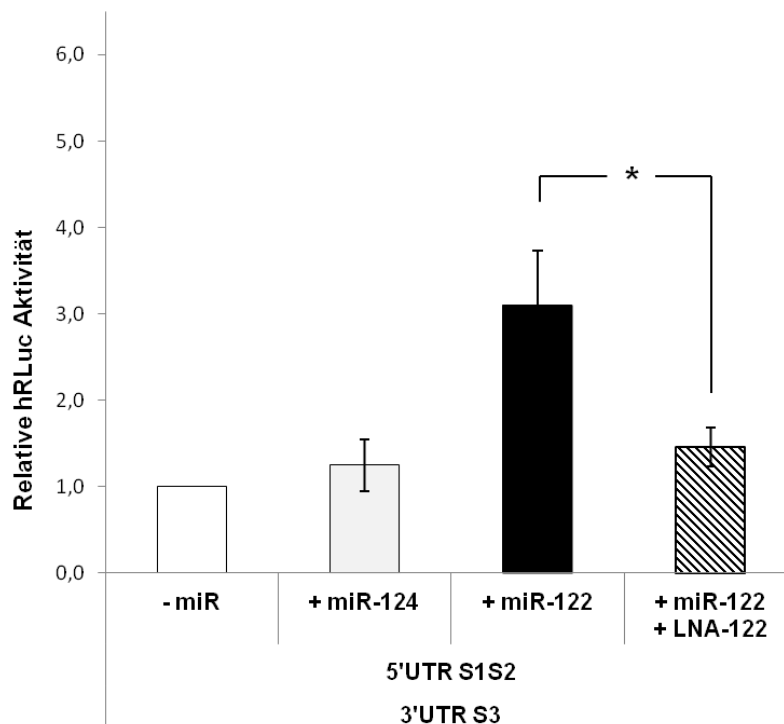


Abbildung 3.10: Luciferase-Assay mit Wildtyp-HCV-Reporter-Konstrukt. HeLa-Zellen wurden mit einer Reporter-RNA, aus wt_{mod} -IRES (S1S2), einem humanisierten *Renilla Luciferase* (hRLuc-) Gen, 21 nt der NS5B-kodierenden Region und der 3'-UTR, transfiziert. Zudem wurden ektopische miR-122, sowie miR-124 (Negativkontrolle) und das miR-122-blockierende *locked nucleic acid* (LNA-122), co-transfiziert. Zu jeder Probe wurde eine m⁷G-, poly(A)-*Firefly Luciferase* (FLuc-) RNA hinzugefügt. Die RLuc-Reporter-Aktivitäten wurden auf die FLuc-Werte normiert, anschließend gemittelt und relativ zum Mittelwert ohne miRNA (- miR) berechnet. Der p-Wert wurde mittels studentischem t-Test (* = $p < 0.05$) ermittelt.

Bei der Betrachtung der mutierten HCV-IRES nach Adressierung beider miRNA-Bindungsstellen mit den kompensierenden miRNAs (+ miR-122m1/m2) ist eine deutliche Steigerung der Translationseffizienz zu beobachten (Abbildung 3.11). Die Stimulation durch miR-122m1 und miR-122m2 ist dabei um etwa 1,5-fach stärker als die Reporter-Aktivität nach Bindung der miR-122 an die wt_{mod} -5'-UTR (vgl. Abbildung 3.10 und Abbildung 3.11). Dies deutet darauf hin, dass entweder die RNA-Stabilität oder aber die Beteiligung einer oder beider miRNAs an der Translationsstimulation im Vergleich zu miR-122-Bindung im wt_{mod} -HCV erhöht ist. Wird die mutierte HCV-RNA von nur einer artifiziellen miRNA adressiert, so zeigt sich, dass die miR-122m1 einen signifikant stärkeren Einfluss auf die Stimulation der Translation hat als miR-122m2 (Abbildung 3.11). Die gemessene Reporter-Aktivität nach Bindung der miR-122m2 an die S2m ist in etwa gleichzusetzen mit der Grundaktivität in der viralen Translation ohne die Beteiligung jeglicher miRNA (- miR, + miR-122 (Negativkontrolle)).

Der Unterschied zwischen der Summe der separat gemessenen hRLuc-Aktivitäten (miR-122m1 + miR-122m2) und des ermittelten Wertes für die Translationseffizienz nach Adressierung beider miRNA-Bindungsstellen (+ miR-122m1/m2) zeigt auch hier einen kooperativen Effekt. Die 1,7-fach höhere Proteinbiosyntheserate ist mit der 1,5-fach höheren Bindungseffizienz in der co-IP (Kapitel 3.2.1.1) vergleichbar.

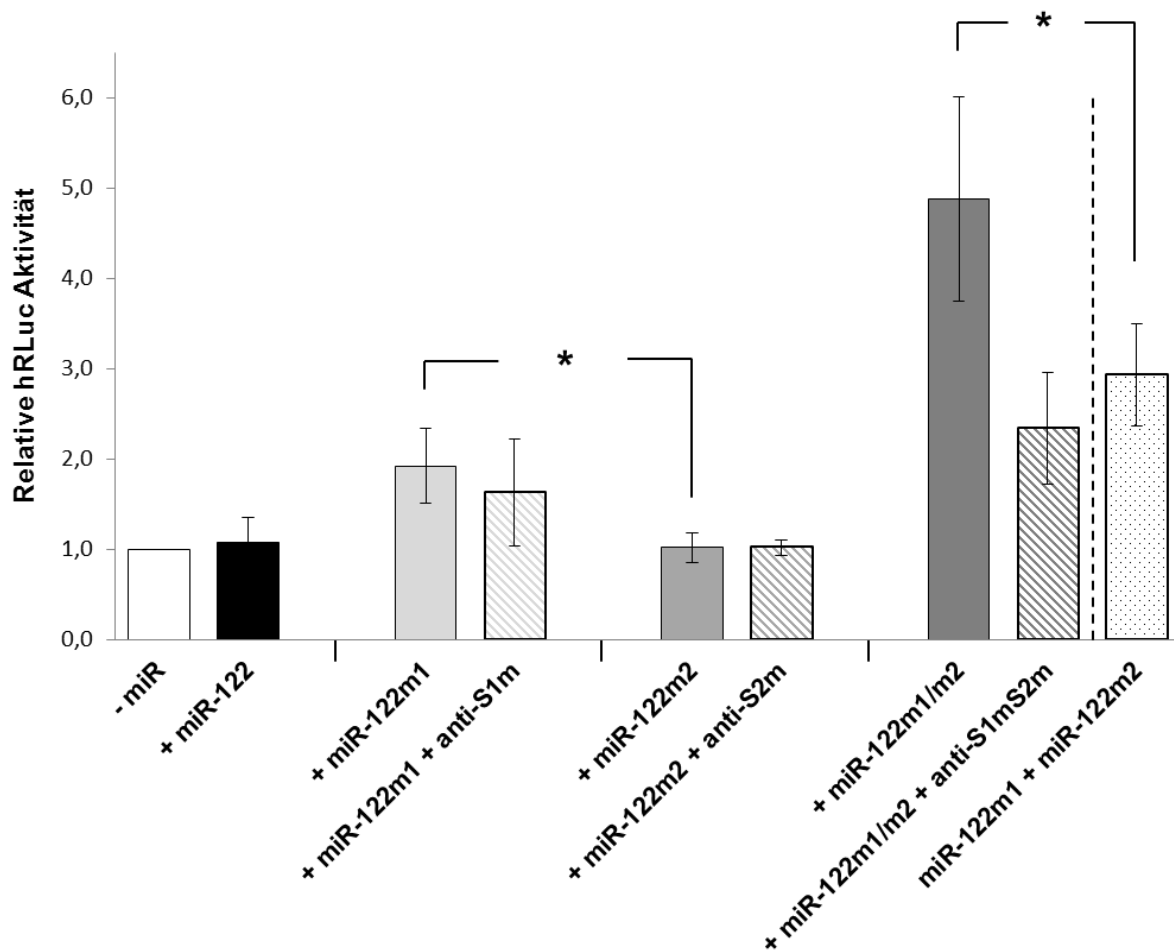


Abbildung 3.11: Luciferase-Assay mit mutiertem HCV-Reporter-Konstrukt. HeLa-Zellen wurden mit einem RNA-Reporter-Konstrukt, bestehend aus mutierter IRES (S1mS2m), einem humanisierten *Renilla Luciferase*- (hRLuc-) Gen, 21 nt der NS5B-kodierenden Region und der 3'-UTR, transfiziert. Darüber hinaus wurden kompensierende miRNAs (miR-122m1, miR-122m2) und miR-122 (Negativkontrolle) co-transfiziert. Die Werte für miR-122m1 und miR-122m2 wurden addiert (miR-122m1 + miR122m2) und mit der Referenzprobe verglichen (+ miR-122m1/m2). Zur Überprüfung der miRNA-spezifischen Stimulation der Translation wurden zudem S1m- und S2m-blockierende 2'-O-methylierte Oligonukleotide (anti-S1m, anti-S2m, anti-S1mS2m) hinzugefügt. Zu jeder Probe wurde eine Cap-Nukleotid-tragende, polyadenylierte *Firefly-Luciferase*- (FLuc-) RNA ergänzt. Die FLuc-Werte wurden zur Normalisierung der gemessenen Signale der RLuc-Reporter-Aktivität verwendet. Die normalisierten Werte wurden für jede Probe gemittelt und relativ zum Mittelwert von HCV-Reporter-RNA ohne Zugabe von miRNA (- miR) berechnet. Dieser Wert wurde dafür auf die Relative hRLuc-Aktivität von „1“ gesetzt. Der p-Wert wurde mittels studentischem t-Test (* = $p < 0,05$) ermittelt.

Die in der co-IP und im EMSA verwendeten LNAs (LNA_{m1} und LNA_{m2}) wurden ebenfalls im Luciferase-Assay getestet, um einen direkten Einfluss der miRNA-Bindung nachzuweisen (nicht gezeigt). Nach Bindung der LNAs an S1m und S2m konnte dabei eine deutlich gesteigerte hRLuc-Aktivität gemessen werden, im Vergleich zur separaten Adressierung mit der entsprechend kompensierenden miRNA. Es wurde vermutet, dass aufgrund der stärkeren Hybridisierung dieser speziellen Nukleinsäuren an die komplementären Sequenzen die HCV-RNA zusätzlich stabilisiert wurde. Durch den Schutz vor nukleolytischem Abbau könnte es dann indirekt zu einer gesteigerten Translationseffizienz

kommen. Daher wurden für die Blockierung der miRNA-Zielsequenzen 2'-O-methylierte DNA-Oligonukleotide (Oligos) verwendet (Abbildung 3.11). Auch diese Modifikation führt zu einer erhöhten Schmelztemperatur nach Hybridisierung der Oligos an komplementäre Sequenzen, allerdings ist diese im Vergleich zu LNAs reduziert.

Über die Hybridisierung von 2'-O-methylierten Oligos an die S1m und/oder S2m im Luciferase-Assay konnte bestätigt werden, dass die beobachtete Steigerung in der Translationseffizienz direkt mit der Hybridisierung der miRNAs an ihre Zielsequenzen zusammenhängt (Abbildung 3.11). Die separate Bindung der blockierenden Oligos an die S1m (anti-S1m) oder S2m (anti-S2m) erfolgt dabei nur relativ schwach. Die Blockierung beider Bindungsstellen durch ein langes Oligo (anti-S1mS2m) war dagegen wesentlich effektiver und konnte die Aktivität der beiden miRNA/Ago-Komplexe, die an die Bindungsstellen S1 und S2 banden, erheblich reduzieren.

Fazit: Mithilfe des Luciferase-Assays konnte eine kooperative Stimulation der Translation nach Adressierung beider miRNA-Bindungsstellen in der HCV-5'-UTR nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis, zusammen mit der bereits zuvor beobachteten kooperativen Bindung der miRNAs nach der co-IP (Kapitel 3.2.1.1), deutet auf eine spezielle synergistische Funktion der miR-122-Bindungsstellen bei der HCV-Akkumulation hin. Die Adressierung der ersten miRNA-Zielsequenz (S1m) in der HCV-5'-UTR scheint an der viralen Translation entscheidend beteiligt zu sein. Ob der stimulierende Effekt auf die Translation allerdings indirekt durch die Stabilisierung der HCV-RNA oder direkt durch eine erhöhte Assoziation von Ribosomen an die HCV-IRES^[153] von den miRNAs beeinflusst wird, ist noch unklar.

3.2.4 Effekt der separaten Adressierung der miRNA-Bindungsstellen in der HCV-5'-UTR auf die Stabilität der RNA

Im Luciferase-Assay konnten Unterschiede in der Translationseffizienz von HCV in Abhängigkeit der miRNA-Bindung an die 5'-UTR detektiert werden (Kapitel 3.2.3). Dabei zeigte die Adressierung der S1m durch die kompensierende miRNA einen besonders starken Einfluss auf die Stimulation der Translation (Kapitel 3.2.3, Abbildung 3.11). Um zu überprüfen, ob die Differenzen der Reporter-Aktivitäten zwischen den einzelnen Proben mit Stabilitätsunterschieden der HCV-RNA zusammenhängen und welche der beiden miRNA-Bindungsstellen maßgeblich vor nukleolytischem Abbau schützt, wurde ein *Ribonuclease* (RNase) *Protection Assay* (RPA) durchgeführt. Über ein radioaktiv markiertes, zur HCV-5'-UTR komplementäres RNA-Fragment (Sonde) wurde die transfizierte HCV-RNA in

einem Gemisch aus nach der Transfektion re-extrahierter zellulärer Total-RNA hybridisiert. Durch Behandlung der Duplexe mit RNasen wurden danach nicht-hybridisierende Sequenz-Überhänge degradiert. Es folgte die Präzipitation der restlichen RNA und die Auftrennung der RNA-Fragmente über ein denaturierendes Polyacrylamidgel. Abschließend konnte die HCV-RNA mittels Autoradiographie detektiert werden.

Eine schematische Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Sonden und ihrer komplementären geschützten RNA-Fragmente der HCV-Reporter-RNA und der FLuc-Kontrolle ist in Abbildung 3.12 gezeigt.

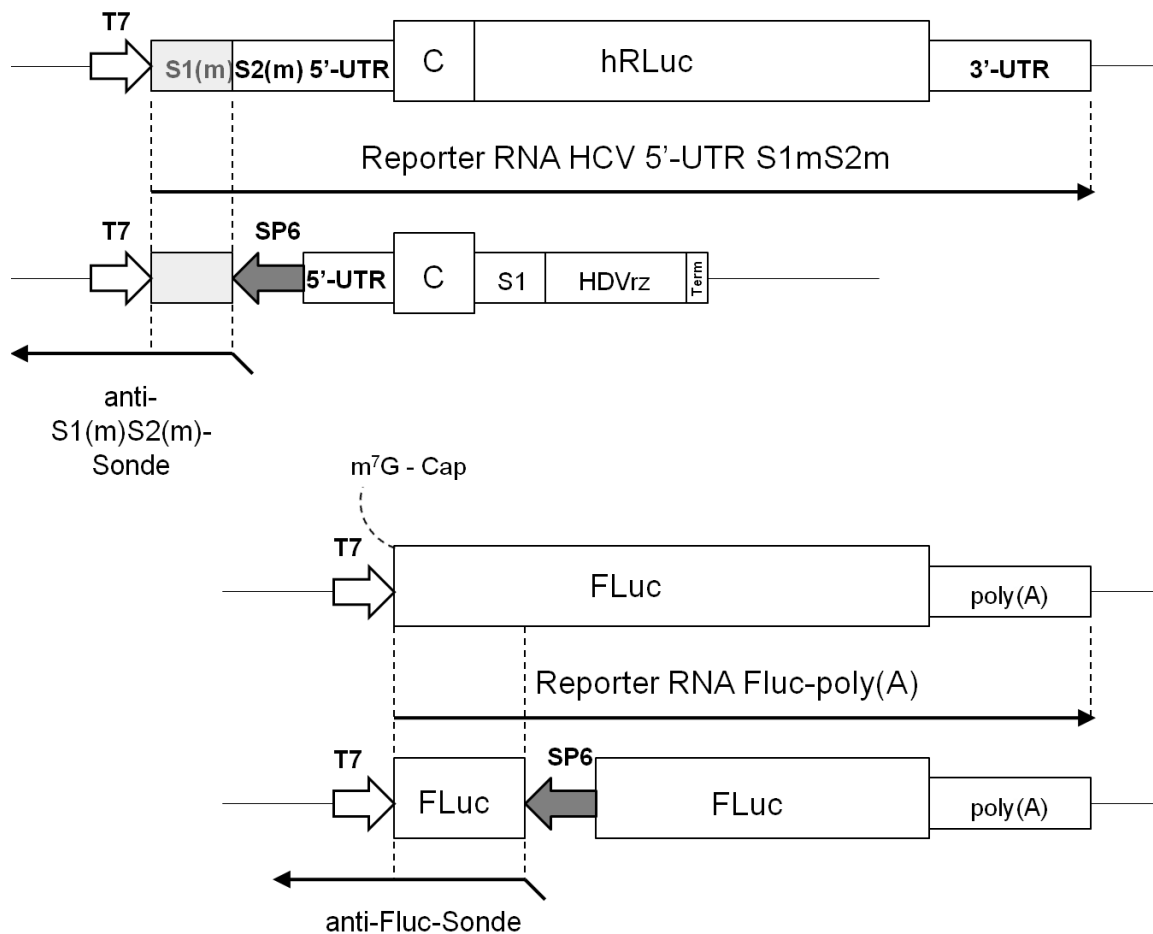


Abbildung 3.12: Schematische Darstellung der im *RNase Protection Assay* (RPA) verwendeten Sonden von HCV und FLuc. Die ersten 159 nt der wt_{mod}- und mut-HCV-5'-UTR können mit der radioaktiv markierten anti-S1(m)S2(m)-Sonde hybridisieren. Die Überhänge der Sonde sowie die nicht-paarenden Sequenzabschnitte der HCV-Reporter-RNA werden während des RPA degradiert. Die Cap-Nukleotid- (m⁷G-) tragende und polyadenylierte (poly(A)-) FLuc-RNA wird nur am 5'-Ende (335 nt) durch die anti-Fluc-Sonde im RPA vor RNase-Verdau geschützt. Der Rest wird degradiert. T7/SP6: Promotoren; C: Core-kodierende Sequenz; hRLuc: humanisiertes *Renilla-Luciferase*-Gen; S1: S1-Aptamer; HDVrz: *Hepatitis Delta Virus Ribozyme*; Term: T7-Terminator; m⁷G: 7-Methylguanosin; FLuc: *Firefly-Luciferase*-Gen.

Zur Herstellung der Sonde für die im Luciferase-Assay verwendeten Reporter-RNAs wurde das pUC18-J6/JFH1-IRES_(mut)-SP6rev-S1-HDVrz-Konstrukt verwendet (Anhang 6.1.6). Dieses Plasmid basiert auf dem pUC18-J6/JFH1-IRES_(mut)-S1-HDVrz-Konstrukt, enthält aber zusätzlich inmitten der 5'-UTR (nach 159 nt) einen SP6-Promotor in gegenläufiger Orientierung. Über PCR wurde zunächst ein spezifisches Ende des Templates für die anti-S1(m)S2(m)-Sonden generiert. Die DNA-Fragmente (inkl. SP6-Promotor) wurden anschließend in die SP6-RNA-Polymerase-abhängige *in vitro*-Transkription eingesetzt. Die RNA (274 nt) wurde dabei während der Synthese, wie bereits für die co-IP beschrieben (Kapitel 3.2.1), radioaktiv markiert.

Darüber hinaus wurde eine Sonde (454 nt) gegen homologe Sequenzbereiche der FLuc-Reporter-RNA präpariert. In das Konstrukt pGEM-4Z FLuc-Poly(A) wurde dafür ebenfalls ein SP6-Promotor so eingefügt (Anhang 6.1.7), dass später im RPA 335 nt des 5'-orientierten Bereichs der co-transfizierten FLuc-Kontrolle detektiert werden können (Abbildung 3.12).

Der RPA wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt (Kapitel 2.2.7.2). Dieses Protokoll entstammt der Dissertation von Y. Song (2006), wurde jedoch hinsichtlich der Sonden-Reinigung für diese Arbeit angepasst. So wurden die radioaktiv markierten Sonden für die HCV-5'-UTR und FLuc-RNA nach der *in vitro*-Transkription präparativ aus denaturierenden Polyacrylamidgelen gereinigt. In einigen Vorversuchen konnten unspezifische Hintergrundsignale beobachtet werden, die vermutlich auf eine Rückhybridisierung der Sonde auf die Template-DNA zurückzuführen waren (nicht gezeigt). Durch die Wahl deutlich längerer PCR-Fragmente (> 1000 bp Sequenz-aufwärts vom SP6-Promotor) konnte zudem die Trennung von den längeren DNA-Templates in denaturierenden Gelen und damit die Reinigung des *in vitro*-Transkriptes optimiert werden (nicht gezeigt).

Für den RPA wurden HeLa-Zellen wie beim Luciferase-Assay mit HCV-Reporter-RNA, miRNAs und der FLuc-Reporter-Kontrolle elektroporiert. Die Zellen wurden nach verschiedenen Zeitpunkten lysiert und die Konzentration an extrahierter, zellulärer RNA (*cellular RNA*; cRNA) bestimmt. Die Integrität der totalen RNA wurde auf einem Agarosegel anhand der Integrität der großen ribosomalen RNAs (4718 und 1874 nt) überprüft (nicht gezeigt).

Zum Test der quantitativen Analyse der Ziel-RNA in einem Gemisch aus cRNA und zur Minimierung möglicher unspezifischer Hintergrundsignale durch die Sonde wurden zunächst verschiedene Mengen cRNA (1000–0,1 ng; 10-er Potenz) mit bestimmten Mengen komplementärer Sonde (100–0,1 ng; 10-er Potenz) hybridisiert und mit RNase behandelt. Für die Titration wurde die wt_{mod}-HCV-Reporter-RNA zusammen mit miR-122 und FLuc-RNA transfiziert und nach 6 h lysiert. Die anti-S1S2- und anti-FLuc-Sonden wurden mit den

verschiedenen Verdünnungen der cRNA über Nacht bei 40 °C hybridisiert. Nach dem RNase-Verdau wurden die Proben zusammen mit Kontrollansätzen mit Proteinase K behandelt und über Phenol/Chloroform gereinigt. Die RNAs wurden über Ethanol präzipitiert und in RNA-Probenpuffer wieder gelöst. Die Proben wurden anschließend in denaturierenden Polyacrylamidgelen aufgetrennt (6 % für HCV-RNA, 4 % für FLuc).

Das Mitführen der Sonde, mit (S+) und ohne (S-) RNase-Behandlung, dient zum Nachweis der RNase-Aktivität. Als zusätzliche Kontrolle (K) wurde die jeweilige Sonde mit dem reinen Reporter-Transkript hybridisiert und ebenfalls mit RNase verdaut. Die zu detektierende Fragmentgröße repräsentiert die maximale Länge einer komplett an ihre Ziel-RNA hybridisierten Sonde. Zudem sollte zwischen „K“ und „S-“ ein deutlicher Höhenunterschied erkennbar sein (eine Differenz von 115 nt für anti-S1S2 und 119 nt für anti-FLuc). Um unspezifische Bindungen der Sonden anti-S1S1 und anti-FLuc mit anderen zellulären RNAs auszuschließen, wurde zudem 1 µg cRNA einer Mock-Kontrolle in eine Hybridisierungsreaktion eingesetzt.

In Abbildung 3.13 ist repräsentativ das Ergebnis des Titrations-RPA mit 1 ng und 0,1 ng der anti-S1S2-Sonde mit einer Verdünnungsreihe der cRNA aus wt_{mod}-HCV-Reporter-transfizierten Zellen gezeigt.

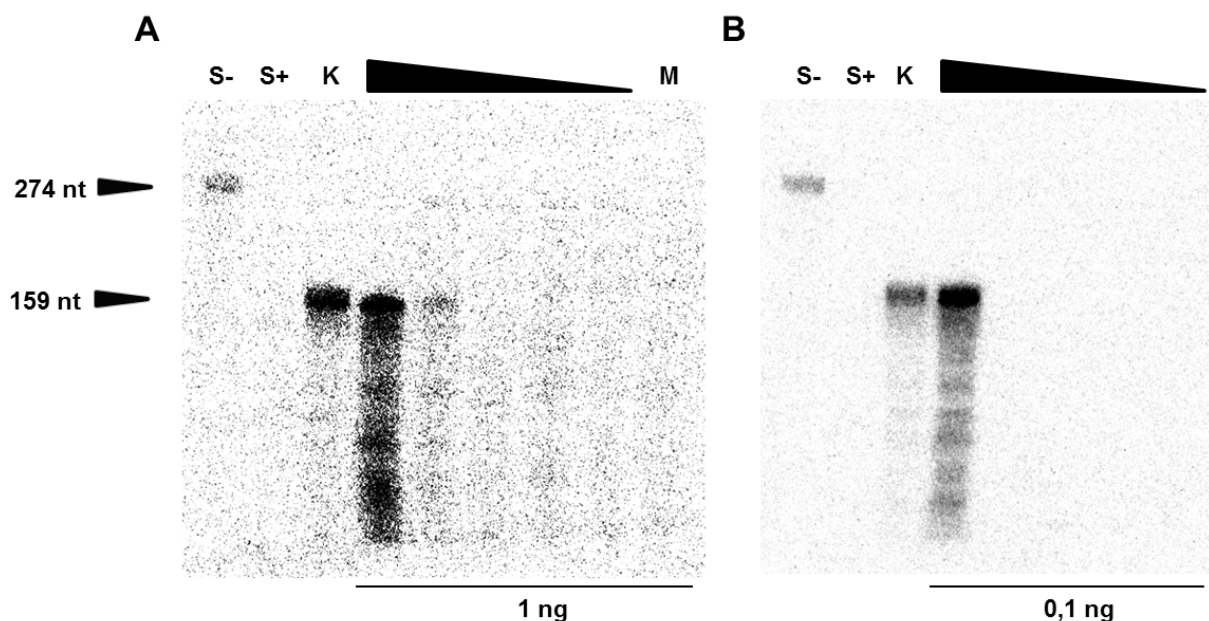


Abbildung 3.13: Titration der anti-S1S2-Sonde mit re-extrahierter, modifizierter Wildtyp- (wt_{mod}-) HCV-Reporter-RNA. Bestimmung der optimalen Menge radioaktiv markierter anti-wt_{mod}-RNA und zellulärer RNA (cRNA) mit unbekannter Menge wt_{mod}-HCV-Reporter-RNA. Dafür wurden 1 ng (A) und 0,1 ng (B) der Sonde jeweils mit einer Verdünnungsreihe von 1000–0,1 ng (10-er Potenz) cRNA getestet. Die Proben wurden über Nacht hybridisiert und anschließend mit RNase-A/T1 inkubiert. Die Duplexe wurden anschließend gereinigt und über 6 %-ige, denaturierende Polyacrylamidgele aufgetrennt. S-: 1:500-Verdünnung von 1 ng Sonde (274 nt) ohne RNasen; S+: 1:500-Verdünnung von 1 ng Sonde mit RNasen; K: Kontrolle (159 nt) aus 1 ng Sonde mit 50 ng HCV-Reporter-*in vitro*-Transkript (1:5-Verdünnung); M: 1 µg cRNA der Mock-Kontrolle mit 1 ng Sonde.

Es wird deutlich, dass mit geringeren Mengen cRNA, bei gleicher Menge an radioaktiv markierter Sonde (Abbildung 3.13, A), die detektierte Signalstärke abnimmt. Der schwache unspezifische Hintergrund verschwindet erst bei einer zusätzlichen Reduktion der Sonden-Menge von 1 ng auf 0,1 ng (Abbildung 3.13, B). Das stärkste Signal resultiert aus der Hybridisierungsreaktion der anti-S1S2-Sonde mit 1 µg cRNA (Abbildung 3.13, A und B). In der Probe mit cRNA der Mock-Kontrolle und anti-S1S2-Sonde ist keine Bande zu erkennen (Abbildung 3.13, A „M“), was auf eine spezifische Bindung der Sonde an ihre Zielsequenz (S1S2) hindeutet (Abbildung 3.13, Vgl. „M“ mit „S+“). Die Banden der einzelnen Proben weisen dieselbe Größe wie die Bande in der Kontrollprobe auf (Abbildung 3.13, „K“). Die zur Sonde komplementäre Sequenz in der wt_{mod}-HCV-Reporter-RNA scheint demnach komplett zu hybridisieren. Zwischen den Banden der nativen Sonde (S-) und der geschnittenen Kontrolle (K) ist ein deutlicher Höhenunterschied zu erkennen. Dies zeigt, über die „S+“-Kontrolle hinaus, den Erfolg der RNase-Reaktion an. Die Differenz beider Banden liegt bei 115 nt (S-: 274 nt, K: 159 nt).

Die Titration von cRNA mit der anti-FLuc Sonde zeigt den gleichen Trend (nicht gezeigt). Der Höhenunterschied von „S-“ zu „K“, bei maximaler Hybridisierung der Sonde, liegt bei 119 nt (S-: 454 nt, K: 335 nt).

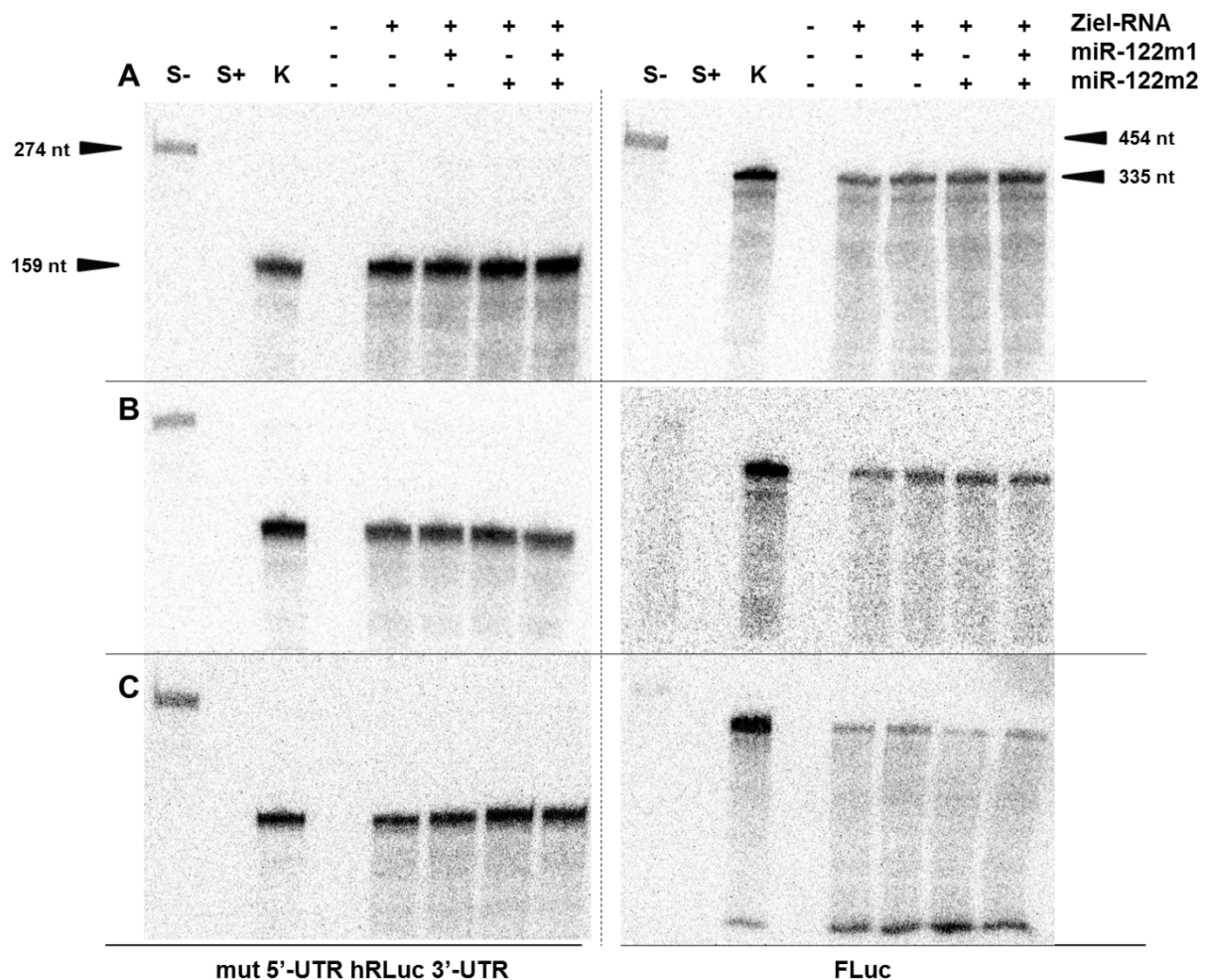
Aufgrund der reduzierten Hintergrundsignale bei Verwendung von nur 0,1 ng der Sonde und des zeitgleich starken Signals nach Inkubation mit 1 µg cRNA (Abbildung 3.13, B) wurde diese Kombination für nachfolgende RPA-Experimente sowohl für den Nachweis von mutierter HCV- als auch FLuc-Reporter-RNA verwendet.

Zur Untersuchung der Integrität der mutierten HCV-5'-UTR in Abhängigkeit von kompensierenden miRNAs wurden die im Luciferase-Assay verwendeten Proben nochmals für den RPA angesetzt (Kapitel 3.2.3, Abbildung 3.11). Dafür wurden beide miRNA-Bindungsstellen der mutierten HCV-5'-UTR separat und zusammen mit miR122m1 und miR-122m2 adressiert und die RNA-Integrität mit der Probe ohne Zugabe ektopischer miRNA verglichen. Die elektroporierten HeLa-Zellen wurden für 6 h, 9 h und 24 h ausgesät und anschließend lysiert. Es wurde 1 µg cRNA mit 0,1 ng der jeweiligen Sonde (anti-S1mS2m, anti-FLuc) hybridisiert. Darüber hinaus wurden die bereits für die Titration verwendet Kontrollen (S- S+, K, M) verwendet (Abbildung 3.13).

Das Ergebnis des RPA ist in Abbildung 3.14 dargestellt. Über einen Zeitraum von 6 h bis 24 h post-Elektroporation (p.e.) ist keine signifikante Reduktion der HCV-5'-UTR-Menge zu beobachten (Abbildung 3.14, A-C). Erst nach 24 h p.e. ist die Konzentration der HCV-Reporter-RNA in den Proben minimal gesunken, was durch eine Reduktion der Bandenstärke angedeutet wird. In wiederholten Experimenten auch mit zusätzlichen Proben nach 36 h p.e. konnte keine signifikante Reduktion der HCV-RNA-Konzentration in

HeLa-Zellen in Abhängigkeit einer miRNA beobachtet werden. Lediglich Proben ohne ektoische miRNA und mit miR-122m1 wiesen gelegentlich eine geringere Bandenstärke der anti-S1mS2m-Sonde auf (nicht gezeigt). Eine eindeutige Tendenz war jedoch nicht zu erkennen. Die Bindung einer miRNA scheint demnach die Gesamtstabilität der eingesetzten viralen RNA in der Zelle nicht signifikant zu erhöhen.

Aufgrund der gleichbleibenden Signale für die anti-S1mS2m-Sonde nach 9 h p.e. (ebenso in Replikaten) kann angenommen werden, dass die im Luciferase-Assay ermittelten Unterschiede in der Translationseffizienz spezifisch durch die Effekte der jeweiligen miRNAs auf die Translation und nicht durch Stabilitätsunterschiede induziert wurden.



3.2.4.1 Untersuchung der 5'-Integrität transfizierter HCV-RNA nach separater Adressierung der miRNA-Bindungsstellen

Auf den Polyacrylamidgelen des RPA konnten nur minimale Unterschiede in der Menge an hybridisierter anti-S1mS2m-Sonde und damit indirekt keine eindeutige Reduktion der Konzentration viraler Reporter-RNA nachgewiesen werden. Zudem wurden keine großen Längen-Differenzen der HCV-5'-UTR im Vergleich zur Kontrolle (K) detektiert (Abbildung 3.14). Um zu überprüfen, ob die Adressierung einer oder beider miRNA-Erkennungssequenzen entscheidend am Schutz vor dem Abbau nur weniger Nukleotide am 5'-Ende beteiligt ist, wurde $\frac{1}{4}$ der Gesamtprobe (Kapitel 3.2.4) auf ein 12 %-iges denaturierendes Polyacrylamidgel beladen (Sequenziergel, 40 cm Länge). Durch das engporige Geflecht und die Länge des Gels kann bereits der Verlust einzelner Nukleotide als Größenunterschied beobachtet werden.

In Abbildung 3.15 sind die Sequenziergele der Proben verschiedener Zeitpunkte zusammengefügt.

Sowohl zwischen den Proben innerhalb eines Zeitpunktes als auch über die Zeitpunkte hinaus können keine Längenunterschiede der anti-S1mS2m-Sonde beobachtet werden. Dies ist am homogenen Bandenmuster der Kontrolle (K) und der einzelnen Proben zu erkennen. Die große Anzahl an Abbau-Banden unter der repräsentativen anti-S1mS2m/5'-UTR-Duplex-Bande macht es schwer, minimale Größenunterschiede zu erkennen. Allerdings ist das jeweils stärkste Bandensignal der Proben und das der Kontrolle auf gleicher Höhe, sodass ein miRNA-spezifischer Längenunterschied der viralen 5'-UTR nicht ersichtlich ist. Einen deutlichen Unterschied in der HCV-Reporter-RNA-Konzentration konnte auf den Sequenziergelen ebenfalls nicht beobachtet werden (vgl. Abbildung 3.14 und Abbildung 3.15).

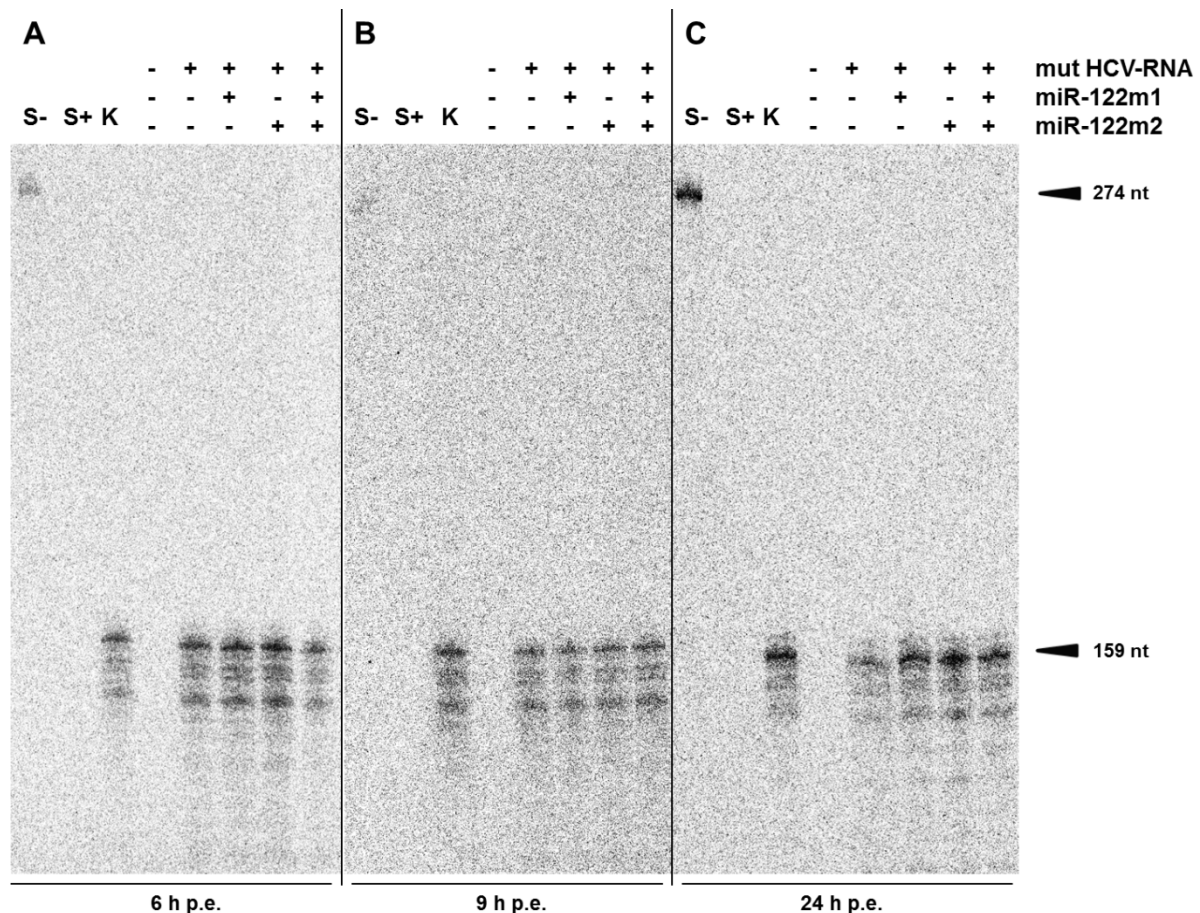


Abbildung 3.15: Analyse der Proben aus dem RNase Protection Assay (RPA) auf einem Sequenziergel. Zur Bestimmung der relativen Länge des detektierten mut-HCV-5'-UTR-Fragments wurde $\frac{1}{4}$ der Proben aus dem RPA auf ein 12 %-iges denaturierendes und 40 cm langes Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Banden wurden über Nacht (~ 22 h) bei 800 V voneinander getrennt. Die getrockneten Gele mit den Proben nach 6 h (A), 9 h (B) und 24 h (C) post-Elektroporation (p.e.) wurden auf *Phosphorimager screens* aufgelegt und die mut-HCV-Reporter-RNA nach Autoradiographie indirekt detektiert. Die Proben wurden 2 Tage lang exponiert. S-: 1:300-Verdünnung von 1 ng Sonde (274 nt) ohne RNasen; S+: 1:300-Verdünnung von 1 ng Sonde mit RNasen; K: Kontrolle (159 nt) aus 1 ng Sonde mit 50 ng HCV-Reporter-*in vitro*-Transkript (1:20-Verdünnung); M: 1 µg cRNA der Mock-Kontrolle mit 1 ng Sonde. „+“: co-transfizierte Nukleinsäure. „-“: ohne angegebene Nukleinsäure.

Fazit: Bei der Untersuchung der Integrität der mut-HCV-Reporter-RNA wurde beobachtet, dass die Stabilität der viralen RNA eines HCV-Minimalkonstrukts nicht ausschlaggebend von der Adressierung mit kompensierenden miRNAs abhängig ist. Es kommt lediglich zu einer minimalen Reduktion der ungebundenen HCV-RNA (24 h–36 h p.e.). Dabei kommt es zu einem kompletten nukleolytischen Abbau der 5'-UTR und nicht nur zu einem Verlust einzelner Nukleotide. Ein kooperativer Effekt auf die Stabilisierung von HCV konnte nicht nachgewiesen werden.

Die gemessenen Reporter-Aktivitäten im Luciferase-Assay (hRLuc und FLuc) wurden von der Integrität viralen RNA nicht beeinflusst (9 h p.e.).

3.3 Herstellung einer mutierten HCV-5'-UTR mit jeweils nur einer mutierten miR-122-Bindungsstelle

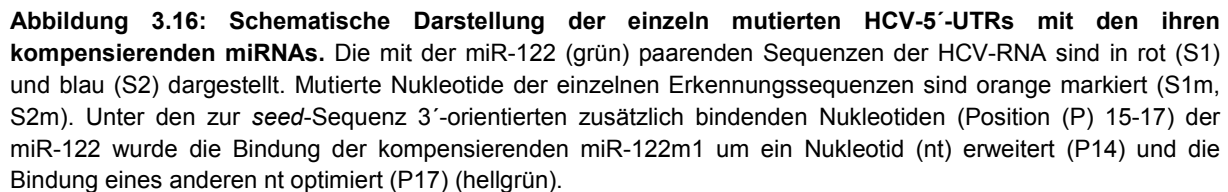
Während der Studien zur Untersuchung der individuellen Funktion der miR-122-Bindungsstellen in der HCV-5'-UTR wurde deutlich, dass es eine unterschiedliche Beteiligung von adressierter S1m und S2m der mutierten IRES-Sequenz an der HCV-Akkumulation gibt. In Translationsstudien konnte ein stärkerer Einfluss durch die miR-122m1-hybridisierte S1m nachgewiesen werden als durch den S2m/miR-122m2-Komplex (Kapitel 3.2.3). Zudem wurde in der co-IP eine stärkere Ago2-miR-122m1-Bindung nachgewiesen (Kapitel 3.2.1.1).

Im Vergleich von wt_{mod}- und mut-HCV-RNA im Reporter-Assay konnte jedoch eine deutlich größere Steigerung der Proteinbiosynthese nach Adressierung von S1mS2m beobachtet werden (Kapitel 3.2.3, Abbildung 3.10, Abbildung 3.11). Dies lässt vermuten, dass die Bindung zwischen mutierter RNA und kompensierenden miRNAs anders ist als jene im miR-122/S1S2-Komplex.

Beim Design der Mutationen in der HCV-5'-UTR und der kompensierenden miRNAs wurde die Bindung von miR-122m1 an S1m um ein Nukleotid verstärkt und das erste Nukleotid der 5'-UTR optimiert, um den reduzierten GC-Gehalt des Duplex auszugleichen (Kapitel 3.1.1, Abbildung 3.3). Bei der zweiten miRNA-Bindungsstelle S2m konnte jedoch eine Reduktion des GC-Gehalts nicht durch zusätzlich paarende Sequenzabschnitte kompensiert werden. So kann es sein, dass, im Vergleich zu miR-122 an S2, die S2m eine deutlich schwächere Bindung an die miR-122m2 in der co-IP aufweist und dadurch nur einen minimalen Beitrag bei der Stimulation der viralen Translation leistet.

Um sicherzugehen, dass die bisher beobachteten Unterschiede der beiden miRNA-Erkennungssequenzen der mut-HCV-RNA die Funktionen von S1 und S2 im Wildtyp widerspiegeln und dass die Ausmaße der ermittelten kooperativen Effekte ähnlich sind, wurden Einzelmутanten hergestellt. Dabei ist jeweils nur eine der beiden miR-122-Bindungsstellen mutiert, während die jeweils andere aber in der Wildtyp-Sequenz vorliegt. Die jeweils native miR-122-Bindungsstelle der einzeln mutierten HCV-5'-UTR sollte anschließend erneut in der co-IP hinsichtlich ihrer Bindungsstärke im Ago2-Kontext sowie im Luciferase-Assay zur Untersuchung der Translationseffizienz überprüft werden.

Aufgrund der bisherigen Strukturanalysen der geplanten Mutationen der miRNA-Bindungsstellen (Kapitel 3.1.1, Abbildung 3.2) wurde folgende Faltung der einzeln mutierten (S1S2m, S1mS2) Sequenzen angenommen und die Bindungsschemata der kompensierenden miRNAs erstellt (Abbildung 3.16).



3.4.1 Anti-Ago2-RNA-co-IP zur Bestimmung der Effizienz der Bindung von miR-122 an die Erkennungssequenzen der einzeln mutierten HCV-5'-UTR

97

miRNA-Duplex ausreicht, um die Proben zeitgleich detektieren und quantitativ auswerten zu können, wurde das Protokoll entsprechend angepasst (Kapitel 3.2.1.1).

In Abbildung 3.17 ist das Ergebnis der co-IP mit separat adressierten miR-122-Bindungsstellen gezeigt. In dieser Abbildung ist zu erkennen, dass die Bindung der miR-122 an S1 (Abbildung 3.17, A3) im Vergleich zur Hybridisierung von miR-122m1 an S1m (Kapitel 3.2.1, Abbildung 3.4, B6) deutlich reduziert ist. Die Intensitäten der Banden von adressierter S1 und S2m (Abbildung 3.17, A3, A5) verhalten sich dabei umgekehrt zueinander als in den Proben mit miRNA-hybridisierter S1m und S2m (Kapitel 3.2.1.1, Abbildung 3.6, A3, A5). Dieses Ergebnis konnte in einem wiederholten Experiment mit der S1S2m-Einzelmutante bestätigt werden (nicht gezeigt). Das Verhältnis der Bandenstärke von S1m und S2 (Abbildung 3.17, C3, C5), nach Adressierung mit ihren kompensierenden miRNAs, ist dagegen mit dem zuvor beobachteten Trend vergleichbar (Kapitel 3.2.1.1, Abbildung 3.6, A3, A5). Aufgrund der Anpassung der Hybridisierung der miR-122m1 an S1m, analog zur miR-122 an ihre Zielsequenz S1 (Kapitel 3.1.1, Abbildung 3.3) war eine reduzierte miR-122-Ago2-abhängige Präzipitation der HCV-IRES nicht zu erwarten. Wenn überhaupt wäre eine schlechtere Bindung und damit ein schwächeres Bandensignal nach Adressierung von S2m mit miR-122m2 (Kapitel 3.2.1, Abbildung 3.4, B7) im Vergleich zu S2-gebundener miR-122 (Abbildung 3.17, B3, B5) zu erwarten gewesen. Bei der Hybridisierung von miR-122m2 an S2m konnte der GC-Gehalt nämlich nicht dem miR-122/S2-Komplex angepasst werden (Kapitel 3.1.1, Abbildung 3.3). Zu vermuten war, dass die Faltung der HCV-5'-UTR (S1S2m) durch die Einzelmutation und dadurch die Zugänglichkeit der miR-122-Bindung an die S1 negativ beeinflusst wurde. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die Strukturen der Einzelmutanten *in silico* überprüft (Kapitel 3.4.2).

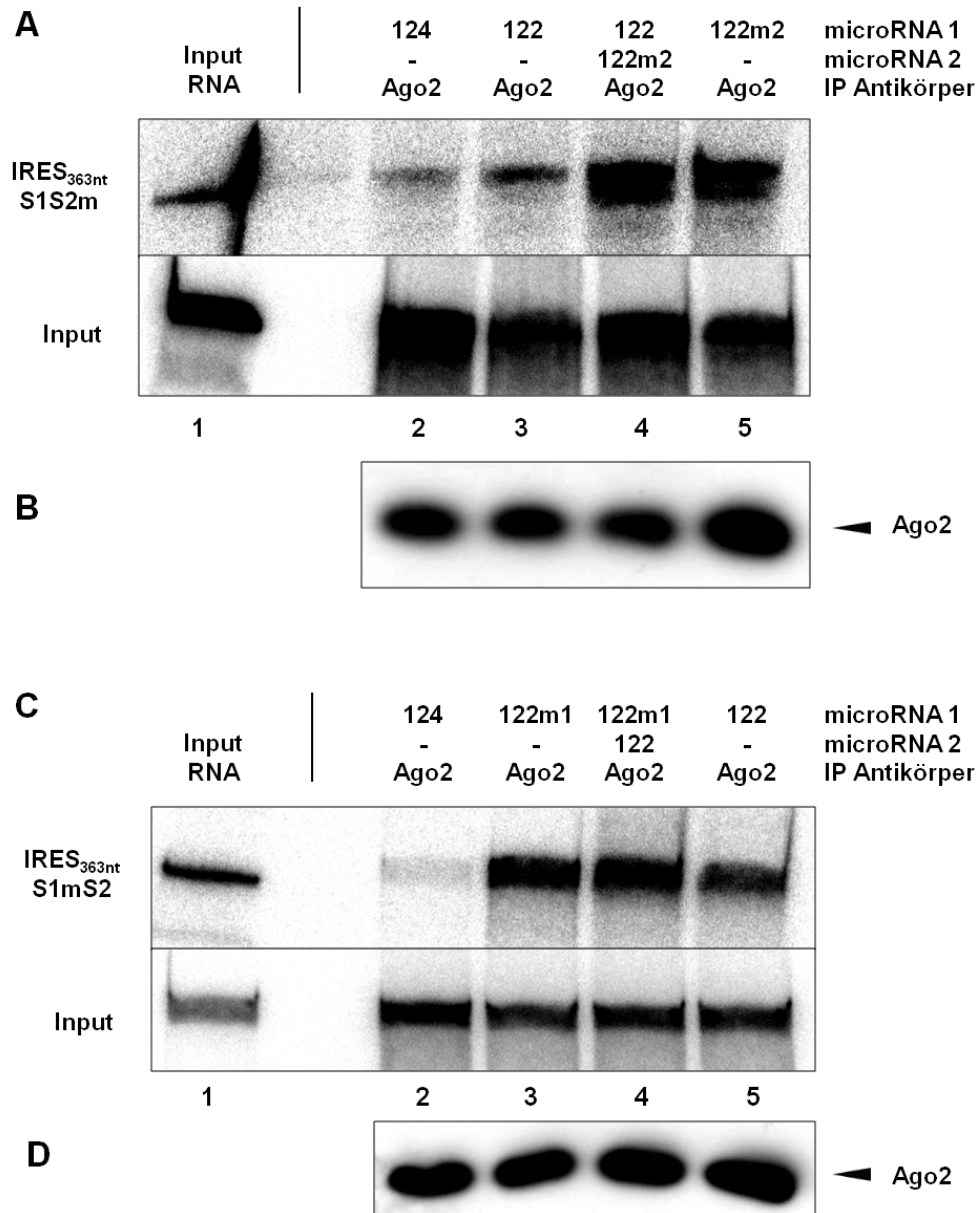


Abbildung 3.17: Anti-Ago2-RNA-co-IP mit einzeln mutierter (S1S2m, S1mS2) HCV-5'-UTR. HeLa-Zellen wurden mit 1 µg radioaktiv markierter HCV-RNA, mit einer Länge von 363 nt, zusammen mit miRNAs transfiziert. 6 h post-Transfektion wurden die Zellen lysiert, wovon 10 % als Input-Kontrolle verwendet wurde (Input; A, C). Das restliche Lysat wurde in der anti-Ago2-Immunpräzipitation verwendet. Nach dem Waschen der zur Präzipitation verwendeten magnetischen *Beads* wurden 10 % für Western Blot Analysen verwendet (B, D). Die co-präzipitierte RNA wurde zusammen mit der Input-Kontrolle gereinigt und präzipitiert. Die RNA-Proben wurden auf 6 %-igen Polyacrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt (A, C). Gereinigtes Transkript wurde als Marker für die RNA-Integrität mitgeführt (1). Die Gele wurden getrocknet und die RNA über Autoradiographie detektiert.

3.4.2 *In silico*-Strukturanalysen der separat mutierten HCV-5'-UTR

Um die Faltung der HCV-5'-UTR nach separater Mutation der miR-122-Bindungsstellen (S1S2m und S1mS2) zu überprüfen, wurde die Strukturbildung der ersten 117 nt (inkl. SLII) der Einzelmutanten *in silico* überprüft. Die Parameter des Programms RNAfold entsprechen denen aus Kapitel 3.1.1. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.18 dargestellt.

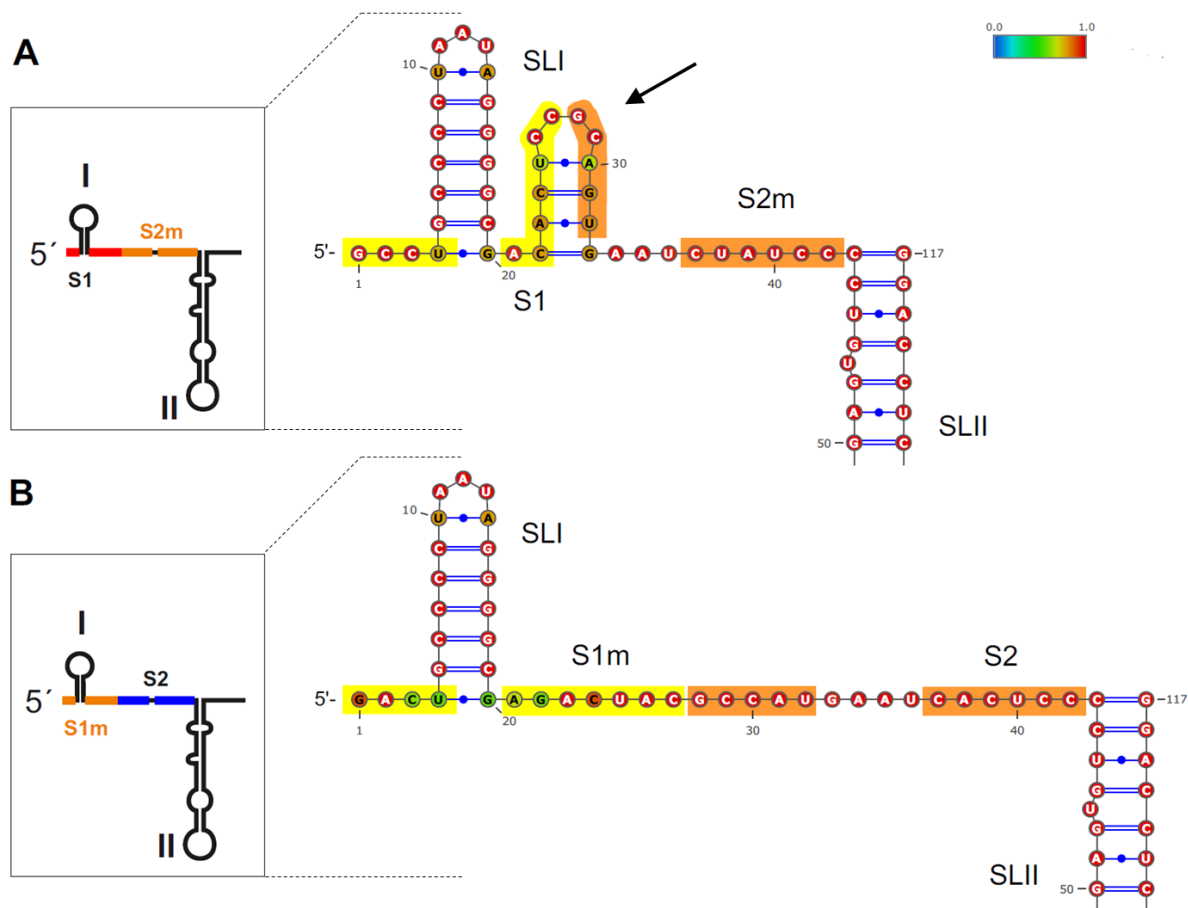


Abbildung 3.18: Modell der Faltung von separat mutierter HCV-5'-UTR. Links: Schematische Darstellung der vermuteten Faltung der einzeln mutierten 5'-UTRs (A) S1S2m und (B) S1mS2. Die miR-122-Erkennungssequenzen sind rot (S1) und blau (S2) dargestellt, während die mutierten Target-Sequenzen (S1m, S2m) orange markiert sind. Rechts: *In silico*-Faltung der Nukleotide 1–117 (inkl. SLII) der jeweiligen 5'-UTR. In gelb und orange markiert sind die miRNA-Bindungsstellen der jeweils einzeln mutierten HCV-5'-UTR. Der Pfeil deutet auf eine zusätzliche Strukturbildung zwischen SLI und SLII der 5'-UTR Sequenz von S1S2m hin. Die Farben zeigen in einzelsträngigen Bereichen die Wahrscheinlichkeit für die Einzelstrangbildung an, während in hybridisierenden Bereichen die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung eines Doppelstrangs gegeben ist. Das Programm zur Faltung der RNA wurde online zur Verfügung gestellt (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>). Die Darstellung dieser Faltung erfolgte über das frei zugängliche Programm VARNAv3-93^[211] und über den wählbaren Vienna Farbcode wurde die Paarungs- und Einzelstrangwahrscheinlichkeit entsprechend der RNAfold-Ausgabe farblich kodiert.

Für die Einzelmutante S1mS2 (Abbildung 3.18, B) konnte die zur Doppelmutante und wt-5'-UTR (Abbildung 3.2) homologe Faltung von SLI und SLII nachgewiesen werden. Dagegen wurde für die Mutante S1S2m mit der wt_{mod}-Erkennungssequenz S1 eine zusätzliche Haarnadelstruktur hinter SLI postuliert (Abbildung 3.18, A). Die erste Bindungsstelle (S1) der miR-122-*seed*-Sequenz bildet dabei den linken Teil dieser Struktur, während die weiter 5'-orientierten Nukleotide der S2m gegenüber der wt-Target-Sequenz den rechten Bereich bilden.

Die beobachtete reduzierte Bindung von miR-122 an S1 (Abbildung 3.17, A3) könnte demnach auf die sterische Hinderung durch die zusätzliche Faltung zwischen SLI und SLII der S2-mutierten HCV-5'-UTR zurückzuführen sein.

Aufgrund der Strukturanalysen ist die Einzelmutante S1S2m für weitere Studien demnach zur Charakterisierung der ersten miR-122-Bindungsstelle in der HCV-5'-UTR unbrauchbar. Lediglich die Mutante S1mS2 wurde für nachfolgende Experimente untersucht und mit den bisherigen Ergebnissen für die S2m der Doppelmutante verglichen.

3.4.3 Bestimmung der Bindungseffizienz der zweiten adressierten miR-122-Bindungsstelle S2 mittels co-IP

Aufgrund der Strukturanalysen (Kapitel 3.4.2) wurden zur Quantifizierung der Signalstärke, der in der co-IP präzipitierten, radioaktiv markierten HCV-IRES nur die Ergebnisse der S1mS2-Einzelmutante verwendet. Die Auswertung der co-IP-Daten wurde wie bereits für die Doppelmutante beschrieben durchgeführt (Kapitel 3.2.1.1). Es wurden ebenfalls die Bandenstärken für drei Replikate mit 1 µg der jeweiligen miRNA (miR-122m1, miR-122) quantifiziert und statistisch ausgewertet. Wie in Abbildung 3.19 zu erkennen ist, ist erneut eine geringere Menge an co-präzipitierter S1mS2-HCV-IRES in der Probe mit miR-122 an S2 zu beobachten als nach Bindung von miR-122m1 an S1m (Abbildung 3.19, B3, B5). Diese Differenz in der Affinität der miRNA an die jeweilige Erkennungssequenz konnte bereits für die Doppelmutante gezeigt werden (Kapitel 3.2.1.1, Abbildung 3.6, A3, A5).

Bei der Quantifizierung der Bandensignale der einzelnen Proben konnte diese Beobachtung bestätigt werden (Abbildung 3.19, C). Die Verhältnisse der relativen DLU von miR-122m1 zu miR-122 und miR-122m1 zu miR-122m2 (Kapitel 3.2.1.1, Abbildung 3.6, B) sind dabei sehr ähnlich ($1,5 \times S1m > S2$ vs. $1,9 \times S1m > S2m$). Der Unterschied zwischen den separat adressierten miRNA-Zielsequenzen, S1m und S2, ist jedoch nicht signifikant. Zudem konnte keine kooperative Bindung nach Adressierung der Einzelmutante S1mS2 mit beiden artifiziellen miRNAs nachgewiesen werden. Die Summe der Mittelwerte für miR-122m1 und miR-122 ist etwa doppelt so groß wie die relativen DLU der gemeinsam hybridisierten

S1mS2-RNA (Abbildung 3.19, C, vgl. „+ miR-122/m1“ mit „miR-122m1 + 122“). Gleiches Ergebnis konnte für die Auswertungen der co-IPs mit 0,3 µg miRNAs beobachtet werden (nicht gezeigt).

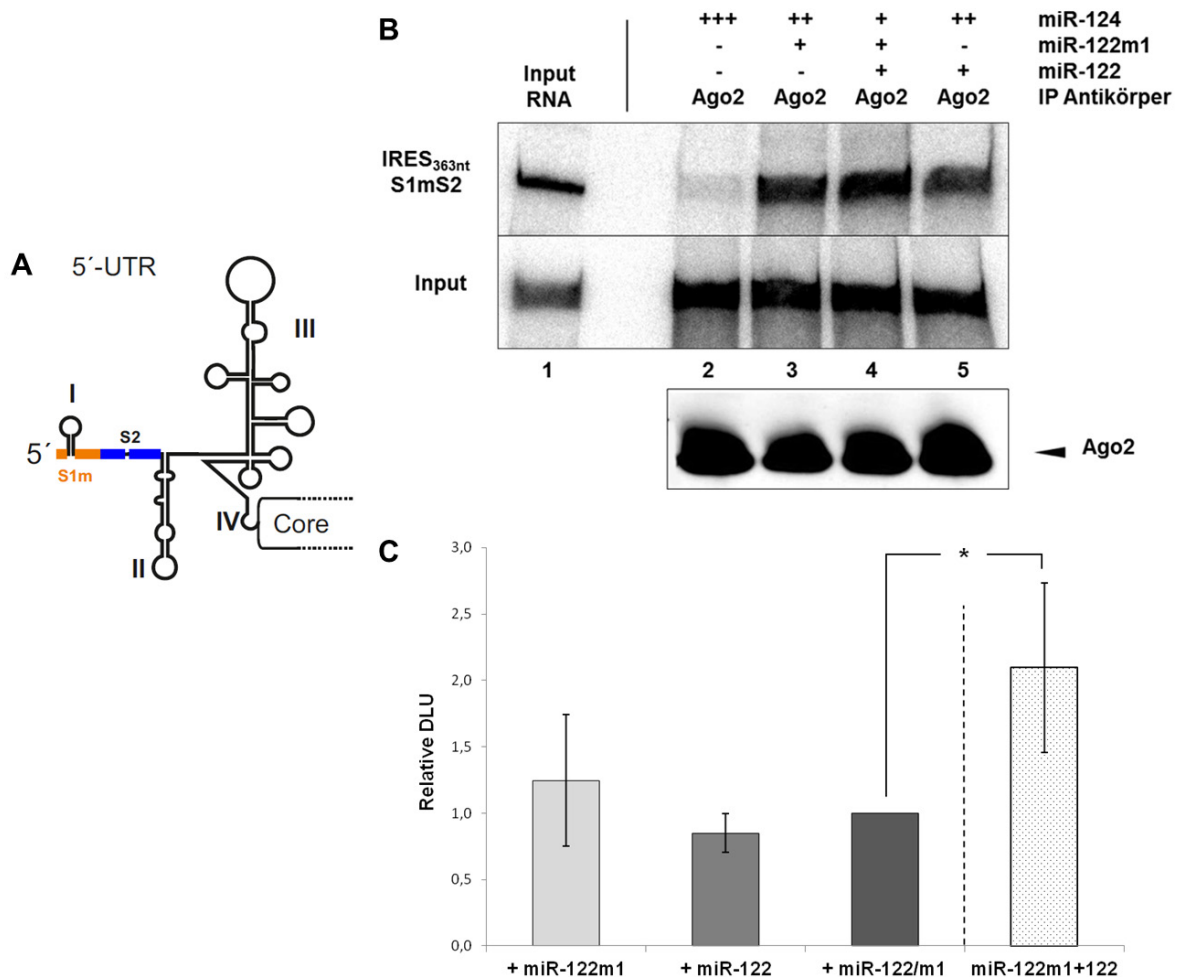


Abbildung 3.19: Effizienz der Bindung der miRNA an ihre Erkennungssequenzen in der einzeln mutierten HCV-5'-UTR. (A) Überblick über die untersuchte wt-miR-122-Bindungsstelle (S2) in der 5'-UTR von HCV. (B) Anti-Ago2-RNA-co-IP mit radioaktiv markierter, einzeln mutierter HCV-IRES (IRES_{363nt} S1mS2) und 1 µg co-transfizierten miRNAs. Die miR-124 diente als Negativkontrolle und zum Auffüllen der miRNA-Menge bei der Transfektion auf 3 µg Total-miRNA. 6 h post-Transfektion wurden die Zellen lysiert: 10 % Lysat als Input-Kontrolle (Input), 90 % für die anti-Ago2-Immunpräzipitation. Nach dem Waschen der magnetischen *Beads* wurden 10 % für Western Blot-Analysen verwendet (Ago2). Die co-präzipitierte RNA wurde zusammen mit der Input-Kontrolle gereinigt und präzipitiert. Die RNA-Proben wurden in 6 %-igen denaturierenden Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Das Transkript wurde als Marker für die RNA-Integrität mitgeführt (1). Die RNA wurde über Autoradiographie detektiert. „+“ – „+++“: 1 µg–3 µg miRNA. (C) Quantitative Auswertung der Autoradiographie von drei co-IPs mit je 1 µg miRNA. Zur Bestimmung der Signalstärke wurden mit Hilfe der OptiQuant™ Software die *Digital Light Units* (DLU) berechnet. Die Werte der Proben wurden auf die Input-Kontrollen normalisiert. Die berechneten Signale für die Proben mit beiden kompensierenden miRNAs wurden anschließend auf „1“ gesetzt und die Werte der anderen Proben relativ dazu berechnet. Die Einzelwerte für miR-122m1 und miR-122 wurden addiert (miR-122m1 + miR122m2) und mit der Referenzprobe verglichen (+ miR-122m1/m2). Der p-Wert wurde mittels studentischem t-Test (* = p < 0.05) ermittelt.

Die zuvor bestätigte kooperative Bindung (Kapitel 3.2.1.1, Abbildung 3.6, B) konnte demnach nicht bestätigt werden.

Allerdings waren die normierten und gemittelten Werte für die separate Hybridisierung von miR-122m1 und miR-122 an die präzipitierte HCV-Einzelmutante deutlich höher als für die virale S1mS2m-RNA (vgl. Abbildung 3.19, C mit Kapitel 3.2.1.1, Abbildung 3.6, B). Somit wäre zu vermuten, dass die Bindung der einzelnen und beiden miRNAs an die separat mutierte S1mS2-RNA im Vergleich zur Adressierung der Doppelmutante deutlich stärker ist.

Fazit: Während der Untersuchungen der miR-122-Bindungsstellen der Einzelmutanten von HCV wurde festgestellt, dass die Struktur der 5'-UTR im HCV-Konstrukt S1S2m durch die Mutation der zweiten miRNA-Bindungsstelle verändert wurde. Die Bildung einer zusätzlichen Haarnadelstruktur führte zu einer sterischen Hinderung bei der Hybridisierung von miR-122 an die S1, wodurch es in der co-IP zu einer deutlich reduzierten Präzipitation der HCV-RNA kam. Die erste miR-122-Bindungsstelle konnte somit in der Wildtyp-Form im Zusammenhang mit der zweiten mutierten Bindungsstelle nicht weiter analysiert werden. Die Charakterisierung der zweiten miR-122-Erkennungssequenz hingegen zeigte deutlich, dass die Bindung an die S2 sowohl in der S1mS2-Einzelmutante als auch in der S1mS2m-Doppelmutante schwächer ist als die Bindung der miR-122m1 an die erste Zielsequenz. Demnach ist zu vermuten, dass für die Adressierung der S1 durch miR-122 in einer korrekt gefalteten 5'-UTR eine ähnliche Differenz zu beobachten wäre. Die Bindungsart der miRNAs an die S1mS2-RNA war jedoch additiv und konnte die für die Doppelmutante nachgewiesene kooperative Bindung der artifiziellen miRNAs nicht bestätigen.

3.4.4 Bestimmung der Translationseffizienz bei separater Adressierung der ersten und zweiten Erkennungssequenz der HCV-5'-UTR durch miR-122

Um zu überprüfen, ob sich die additive Bindung beider artifizieller miRNAs an die S1mS2-5'-UTR auch in einer additiven Stimulation der viralen Translation äußert oder aber die expositionsabhängige Quantifizierung der co-IP-Ergebnisse zu falsch negativen Ergebnissen führte, wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt. Dafür wurde zunächst die einzelne Mutation in der ersten miRNA-Bindungsstelle in das bereits beschriebene Reporter-Konstrukt über Mutagenese eingefügt (Kapitel 3.2.3). Aufgrund der verbleibenden miR-122-Erkennungssequenz in der HCV-5'-UTR wurde zudem die S3 des Konstruktes mutiert (Abbildung 3.20), um eine zusätzliche Bindung der ektopischen miR-122 an die 3'-UTR zu verhindern (Dissertation N. Dünnes, 2016).

Die mutierte Bindungsstelle S3m wurde ebenso im wt_{mod}- und im HCV-Reporter-Konstrukt mit S1mS2m eingefügt, um die Ergebnisse des Translationsassays mit dem der Einzelmutante direkt vergleichen zu können. Dabei sollte auch der Effekt nach Adressierung der zweiten miRNA-Bindungsstelle zwischen den verschiedenen Konstrukten verglichen werden.

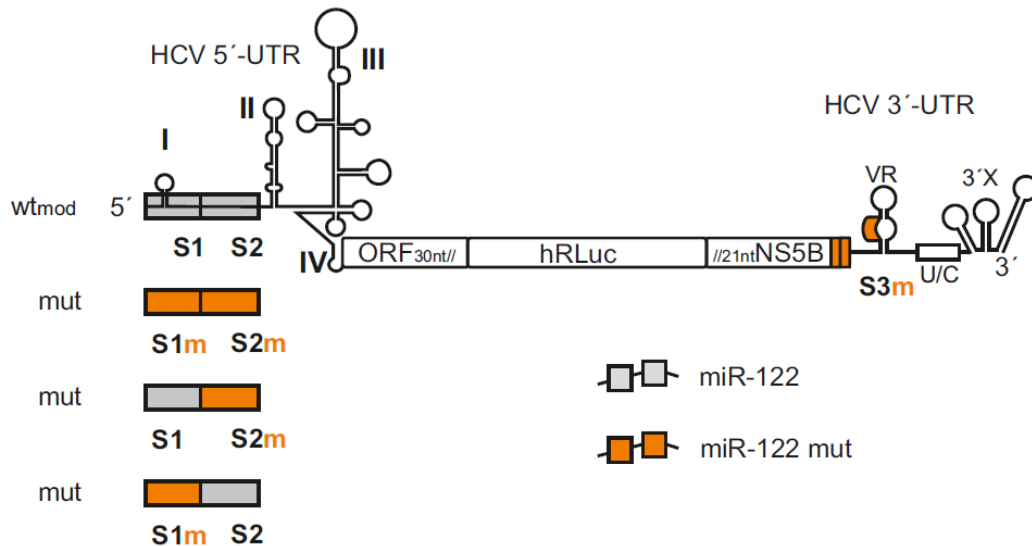


Abbildung 3.20: Schematische Darstellung der HCV-Reporter-Konstrukte mit Einzelmutanten. Gezeigt sind die HCV-Reporter-Konstrukte mit der viralen 5'-UTR inklusive Start-Kodon und 30 nt der Core-kodierenden Sequenz des *open reading frame* (ORF) sowie 21 nt des 3'-Endes der NS5B-kodierenden Region mit nachfolgender 3'-UTR. Im ORF befindet sich das humanisierte *Renilla-Luciferase*-Gen. Orange markiert sind die mutierten miRNA-Bindungsstellen in der 5'- und 3'-UTR, während die miR-122-Erkennungssequenzen grau dargestellt sind. Im Luciferase-Assay werden die modifizierte Wildtyp- (wt_{mod}-) und mutierten (mut-) 5'-UTRs (S1S2, S1mS2m, S1S2m, S1mS2) von HCV mit kompensierenden miRNAs (miR-122, miR-122 mut) adressiert. S3m: mutierte, dritte miR-122-Bindungsstelle der HCV-UTRs (3'-UTR).

Zur Überprüfung der Hypothese, dass die veränderte Struktur der 5'-UTR der S1S2m-Einzelmutante die Bindung der miR-122 an S1 reduziert und damit auch eine reduzierende Wirkung auf die Proteinbiosynthese hat, wurde diese ebenfalls als Reporter-RNA in HeLa-Zellen transfiziert (Abbildung 3.20). Für die Messung der Reporter-Aktivitäten verschiedener 5'-UTRs, gebunden an artifizielle miRNA/Ago2-Komplexe, wurde der Luciferase-Assay wie bereits beschrieben durchgeführt (Kapitel 3.2.3).

Die Ergebnisse der gemessenen Reporter-Aktivitäten für die verschiedenen Konstrukte nach Co-Transfektion mit der jeweils kompensierenden miRNA oder in Kombination sind in Abbildung 3.21 dargestellt.

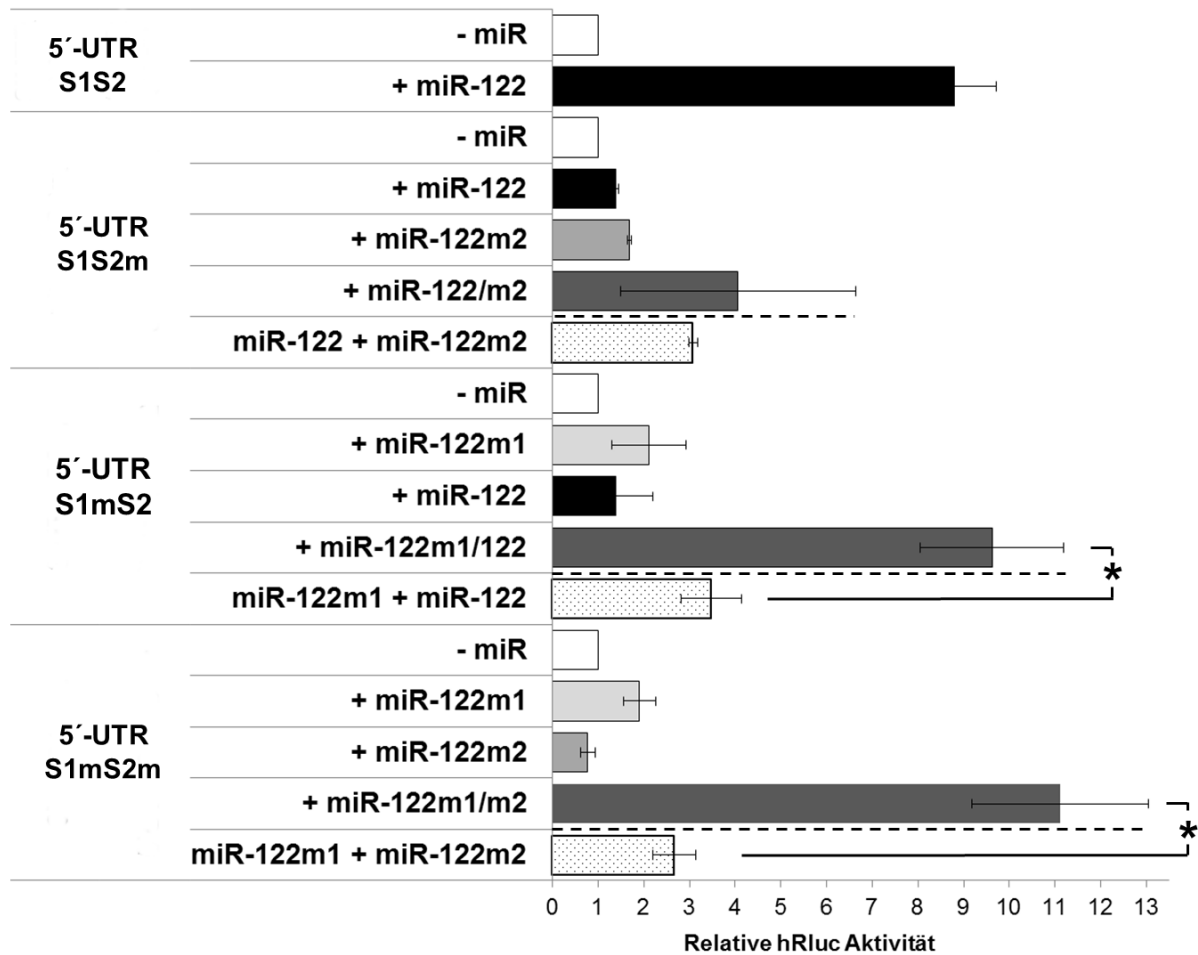


Abbildung 3.21: Luciferase-Assay mit modifiziertem Wildtyp- und mutierten HCV-Reporter-Konstrukten. HeLa-Zellen wurden mit einem RNA-Reporter-Konstrukt, bestehend aus wt_{mod}- (S1S2) oder mutierter (S1(m)S2(m)) 5'-UTR, einem humanisierten *Renilla-Luciferase*- (hRLuc-) Gen, 21 nt der NS5B-kodierenden Region und der mutierten 3'-UTR, transfiziert. Darüber hinaus wurden kompensierende miRNAs co-transfiziert. Zu jeder Probe wurde eine Cap-Nukleotid tragende, polyadenylierte *Firefly-Luciferase*- (FLuc-) RNA ergänzt. Die FLuc-Werte wurden zur Normalisierung der gemessenen Signale der RLuc-Reporter-Aktivität verwendet. Die normalisierten Werte für jede Probe wurden gemittelt und relativ zum Mittelwert von HCV-Reporter-RNA ohne Zugabe von miRNA (- miR) berechnet (Relative hRLuc-Aktivität = „1“). Die Werte der Proben mit separat adressierten miRNA-Bindungsstellen wurden addiert (miR-122(m1) + miR122(m2)) und mit der Referenzprobe verglichen (+ miR-122(m1))/(m2)). Der p-Wert wurde mittels studentischem t-Test (* = $p < 0.05$) ermittelt.

Die stärkere Beteiligung von S1 an der Stimulation der Translation ist sowohl nach Adressierung der Bindungsstelle in der Einzelmutante S1mS2 als auch für das Reporter-Konstrukt S1mS2m zu beobachten. Dieser Effekt ist auf eine stärkere Bindung der miR-122m1 an S1m zurückzuführen (Kapitel 3.2.1.1, Abbildung 3.6, B; Kapitel 3.4.3, Abbildung 3.19, C). Die Hybridisierung von miR-122 an S1 der S1S2m-Reporter-RNA ist jedoch im Vergleich zum Ago2/miR-122m2/S2m-Komplex reduziert (Kapitel 3.4.2, Abbildung 3.18, A), was bereits in co-IP-Studien gezeigt werden konnte (Kapitel 3.4.1, Abbildung 3.17, A3). So kann der stärkere Effekt der adressierten S1m für die native Erkennungssequenz nicht bestätigt werden. Im Luciferase-Assay zeigt diese Erkennungssequenz in Abhängigkeit

der miR-122 ebenfalls einen reduzierten Einfluss im Vergleich zur Mutante (Abbildung 3.21), obwohl die Affinität der wt-miRNA im Vergleich zur miR-122m1 erhöht sein sollte (Kapitel 3.1.1, Abbildung 3.3).

Die Beteiligung der zweiten miRNA-Zielsequenz an der Initiation der Proteinbiosynthese ist im Vergleich zur ersten Bindungsstelle gering (Abbildung 3.21, S1mS2, S1mS2m). Da die Tendenz der Reporter-Aktivitäten von adressierter S1m und S2m mit der von S1m und S2 vergleichbar ist, kann für die Reporter-RNA mit S1S2m ein ähnlicher Effekt erwartet werden (Abbildung 3.21). Das geringere Signal nach Hybridisierung der miR-122m2 an S2m der HCV-Doppelmutante, im Vergleich zur Intensität der Luciferase-Expression der Einzelmutante S1mS2 nach Bindung von miR-122 an S2, ist vermutlich auf den reduzierten GC-Gehalt (Kapitel 3.1.1, Abbildung 3.3) und damit schwächere Bindung der mutierten miR-122 an ihre Zielsequenz zurückzuführen. Somit könnte für die erste miR-122-Bindungsstelle angenommen werden, dass diese etwas stärker von der miRNA adressiert wird als S1m durch miR-122m1.

Der Effekt der jeweils separaten Adressierung beider miRNA-Bindungsstellen auf die Proteinbiosynthese ist in der HCV-IRES von S1mS2 stärker als für die Reporter-RNA S1mS2m (Abbildung 3.21). Diese Tendenz konnte bereits in der Bindungsstärke der artifiziellen miRNAs der verschiedenen, mutierten RNAs gezeigt werden (Kapitel 3.2.1.1, Abbildung 3.6, B; Kapitel 3.4.3, Abbildung 3.19, C). Die synergistische Hybridisierung beider miRNAs an S1mS2 zeigt jedoch, entgegen der in der co-IP nachgewiesenen additiven Bindung (Kapitel 3.4.3, Abbildung 3.19, C), einen signifikant kooperativen Effekt auf die Stimulation der HCV-Translation (Abbildung 3.21). Dieser ist im Vergleich zur Adressierung der doppelt-mutierten HCV-5'-UTR und trotz erhöhter Reporter-Aktivitäten für separat adressierte Bindungsstellen etwas niedriger (Abbildung 3.21, vgl. S1mS2 und S1mS2m). Aufgrund der zur Doppelmutante homologen Ergebnisse für die Stimulation der Translation und die bereits nachgewiesene kooperative Bindung beider miRNAs an S1mS2m (Kapitel 3.2.1.1, Abbildung 3.6, B), ist die observierte additive Bindungsstärke in der S1mS2-RNA (Kapitel 3.4.3, Abbildung 3.19, C) vermutlich ein falsch-negatives Ergebnis. Diese Vermutung kann jedoch weder bestätigt noch widerlegt werden, da die S1S2m-Mutante wegen der differenziellen Faltung in der co-IP nicht sinnvoll charakterisiert verwendet werden konnte.

Durch die zeitliche Begrenzung der hier vorliegenden Arbeit war eine separate Untersuchung der RNA-Stabilität der HCV-Einzelmutanten in Abhängigkeit der miR-122 leider nicht mehr möglich. Da jedoch die Wildtyp- und mutierten miRNA-Bindungsstellen nach Adressierung mit ihren jeweiligen miRNAs dieselbe individuelle Funktion zeigten, kann zumindest angenommen werden, dass die gemessenen Reporter-Aktivitäten nicht von Stabilitätsunterschieden abhängig, sondern miRNA/Ago2-spezifisch sind.

Fazit: Im Luciferase-Assay, mit separat- und doppelt-mutierten Reporter-RNAs konnte eine stark kooperative Stimulation der viralen Genexpression beobachtet werden. Die Zugänglichkeit der miRNA-Bindungsstelle ist dabei von entscheidender Bedeutung. Aufgrund der tendenziell schwächeren Translationsstimulation der zweiten miRNA-Zielsequenz in den strukturell intakten Reporter-RNAs ist für die wt-HCV-RNA anzunehmen, dass eine Adressierung der Bindungsstelle S1 mit miR-122 stärker an der HCV-Akkumulation beteiligt ist als die Adressierung der Bindungsstelle S2.

3.5 Exkurs: Überprüfung einer möglichen Überkreuz-Funktion von miR-122

In diesem Abschnitt geht es um die Untersuchung einer Arbeitsgruppen-übergreifenden Hypothese. Diese wurde auf dem „21. internationalen Symposium über HCV und ähnliche Viren“ auf einem Poster von Thibault und Wilson präsentiert (P.3.53, September 2014). In der erwähnten Arbeit ging es um die individuelle Funktion der miR-122-Erkennungssequenzen in der HCV-5'-UTR in Bezug auf die Stimulation der viralen Replikation. Aufgrund ihrer Mutationsstudien wurde angenommen, dass beide miR-122-Moleküle möglicherweise eine Art Überkreuz- (*Cross-over*-) Bindung in der 5'-UTR eingehen und zu einer *pseudoknot*-ähnlichen Struktur in diesem Bereich der HCV-RNA führen. Dabei sollen die weiter 3'-orientierten hybridisierenden Nukleotide an den entsprechenden Sequenzabschnitt der anderen Zielsequenz binden (Abbildung 3.22, A). Diese Änderung in der Faltung könnte, so die Hypothese, einen Einfluss auf die virale Translation und Replikation haben.

Um diese hypothetische, ungewöhnliche Hybridisierung der miR-122 an ihre Zielsequenzen der HCV-RNA zu überprüfen, wurden für die separat adressierbare zweifach-mutierte HCV-5'-UTR (Abbildung 3.22, B) miR-Duplexe mit entsprechend abgewandelten Nukleotiden entworfen. Die Sequenzen des jeweiligen Führungsstrangs sind der Abbildung 3.22 (C) zu entnehmen. Die Gegenstränge in den Duplexen wurden entsprechend modifiziert, um die thermodynamische Stabilität in den einzelnen Bereichen der Duplexe konstant zu halten.

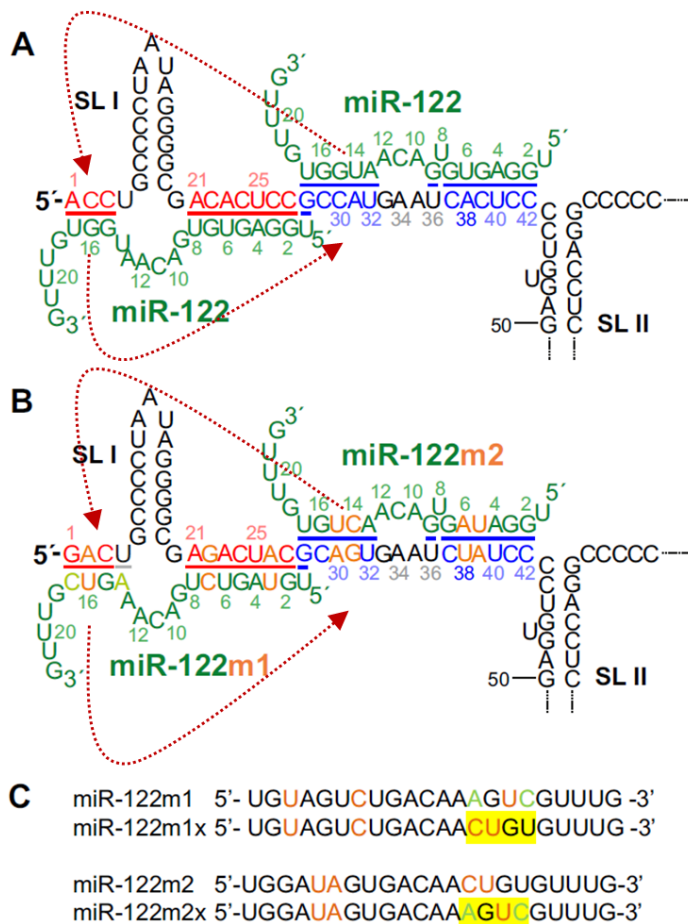


Abbildung 3.22: Schematische Darstellung der Überkreuz-agierenden miRNAs in der HCV-5'-UTR. Überblick über die Faltung von SLI und SLII der wt- (A) und mutierten (B) 5'-UTR mit detaillierten Ausschnitten der artifiziiellen miRNA-Bindungsstellen. Mutierte Nukleotide der einzelnen Erkennungssequenzen sind orange markiert. Die rotgestrichelten Pfeile deuten auf eine mögliche alternative Hybridisierungsmöglichkeit der zusätzlich bindenden Nukleotide am 3'-Ende der miRNA-Sequenz mit der HCV-5'-UTR hin. (C) Sequenzen der originalen miR-122m1- und miR-122m2-Führungsstränge und der neu designnten Cross-over-miRNAs (miR-122m1x, miR-122m2x).

Die Bindung von aktiven miRNA/Ago2-Komplexen an die HCV-IRES wurde über die bereits beschriebene co-IP getestet (Kapitel 3.2.1). Über die neuen *Cross-over*-miRNAs (miR-122m1x und miR-122m2x) hinaus wurden die artifiziielle miR-122m1 und miR-122m2 als zusätzliche Kontrollen co-transfiziert. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 3.23 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass in den Proben mit den neuen *Cross-over*-miRNAs (Spalte 6 und 7) im Vergleich zu den bereits getesteten artifiziiellen miRNAs (Spalte 4 und 5) deutlich weniger bis gar keine radioaktiv markierte HCV-RNA präzipitiert wurde. Allerdings unterscheiden sich die Input-Kontrollen der einzelnen Proben voneinander: v.a. die mit miR-124 und miR-122m2x co-transfizierten Proben zeigen eine deutlich reduzierte Menge an HCV-RNA (Abbildung 3.23, A7 und 8). Die Western Blot-Analysen zeigen hingegen, dass die Menge an Ago2 in jeder Probe gleich war (Abbildung 3.23, B). So ist anzunehmen, dass die unterschiedlichen Bandenstärken auf Pipettier- Ungenauigkeiten bei der Aufarbeitung der Input-Proben zurückzuführen sind. Eine Bindung von miR-122m2x an die HCV-RNA kann dadurch jedoch nicht ausgeschlossen werden. Leidglich das Signal für die Probe mit miR-122m1x ist klar negativ.

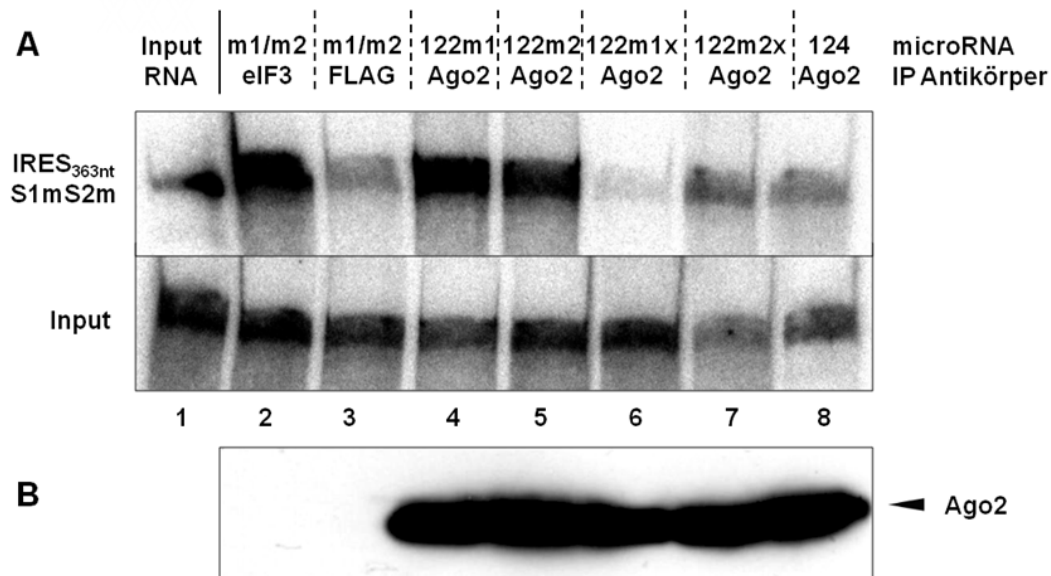


Abbildung 3.23: Anti-Ago2-RNA-co-IP mit doppelt-mutierter (S1mS2m) HCV-5'-UTR. HeLa-Zellen wurden mit radioaktiv markierter HCV-RNA, mit einer Länge von 363 nt, zusammen mit miRNAs transfiziert. 6 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert, wovon 10 % als Input Kontrolle verwendet wurde (Input; A). Das restliche Lysat wurde in der anti-Ago2-IP verwendet. Als Positiv- bzw. Negativkontrolle dienten Antikörper gegen eIF3 (2) und FLAG (3). Nach dem Waschen der zur Präzipitation verwendeten magnetischen *Beads* wurden 10 % für Western Blot-Analysen verwendet (B). Die co-präzipitierte RNA wurde zusammen mit der Input-Kontrolle gereinigt und präzipitiert. Die RNA-Proben wurden auf 6 % Polyacrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt (A). Gereinigtes Transkript wurde als Marker für die RNA-Integrität mitgeführt (1). Die Gele wurden getrocknet und die RNA über Autoradiographie detektiert.

Die Ergebnisse dieser co-IP sprechen zunächst dafür, dass die miR-122m1x und miR-122m2x in dieser Form nicht an die IRES binden können. Es könnte jedoch sein, dass diese ungewöhnliche Bindung zwar möglich ist, jedoch nicht dominierend *in vivo* vorkommt und entsprechend mit dieser Methode nicht detektierbar ist. Da die Bindung dieser *Cross-over*-agierenden miRNAs vermutlich zu schwach ist, um diese im Kontext mit Strukturänderungen der 5'-UTR nachweisen zu können, wurde der bereits beschriebene EMSA durchgeführt (Kapitel 3.2.2). Diese Methode ermöglicht die *in vitro*-Bindung der jeweiligen miRNA ohne störende Faktoren und unter optimalen Bedingungen für die Hybridisierung. Die Detektion einer Hybridisierung würde jedoch nur die Möglichkeit einer derartigen Überkreuz-Reaktion der miR-122-Moleküle in der HCV-5'-UTR aufzeigen und wäre immer noch kein Beweis dafür, dass diese auch unter *in vivo*-Bedingungen auftreten würde.

Das Ergebnis der EMSA-Studie ist in Abbildung 3.24 dargestellt.

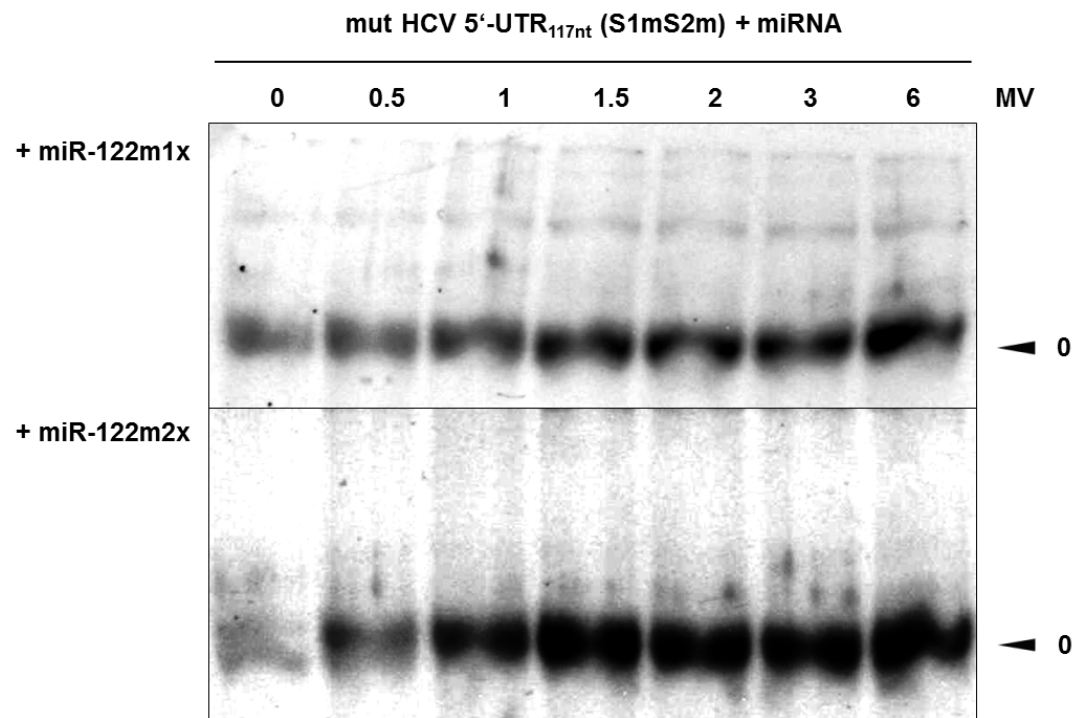


Abbildung 3.24: Electrophoretic Mobility Shift Assay der mutierten HCV-5'-UTR mit Cross-over-miRNAs. Es wurden 4 pmol eines 117 nt langen radioaktiv markierten HCV-5'-UTR-Fragments (inkl. SLII) mit steigenden molaren Mengen einzelsträngiger miR-122m1x oder miR-122m2x hybridisiert. Die Komplexe wurden anschließend über ein 12 %-iges nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert. Die Position und Anzahl der einzelnen Banden ist über Pfeile mit arabischen Ziffern markiert. MV: Molares Verhältnis.

Weder für die Proben mit steigenden Molaren Verhältnissen an miR-122m1x noch für solche mit miR-122m2x-Führungsstrang konnte ein verzögertes Laufverhalten einer Bande nachgewiesen werden. Gleiches Bild zeigte sich in EMSAs mit der miR-122m1 (Kapitel 3.2.2, Abbildung 3.8), obwohl im Gegensatz dazu die funktionelle Bindung im Ago2-Komplex von miR-122m1 an die HCV-RNA nachgewiesen werden konnte (Kapitel 3.2.1, Abbildung 3.5). Somit ist sogar unter optimalen Bedingungen keine Überkreuz-Bindung der miR-122m1x und miR-122m2x nachweisbar.

Fazit: Eine Bindung der Cross-over-miRNAs an die HCV-5'-UTR ist weder über die co-IP in Form von miRNA/Ago2-Komplexen nachzuweisen noch im EMSA unter Anwesenheit hoher Konzentrationen Mg^{2+} zur Unterstützung der Hybridisierungsreaktion. Diese Art der Bindung von miR-122 an ihrer Erkennungssequenzen der HCV-RNA ist entweder nicht existent oder aber sehr schwer zu detektieren, so dass vermutet werden muss, dass diese am HCV-Replikationszyklus nicht entscheidend beteiligt ist. Die Hypothese einer Überkreuz-Bindung der miR-122-Moleküle an die HCV-IRES der Arbeitsgruppe von J.A. Wilson konnte demnach nicht bestätigt werden.

4 Diskussion

Die leberspezifische miR-122 spielt eine Schlüsselrolle im HCV-Replikationszyklus. Es befinden sich mehrere konservierte miR-122-Bindungsstellen im HCV-Genom, von denen die zwei Erkennungssequenzen in der 5'-UTR (S1, S2) am besten charakterisiert sind. Die Hybridisierung der miRNA an diese Sequenzen, welche sich zwischen SLI und SLII befinden, erfolgt direkt ^[162] und in einem Komplex mit Ago-Proteinen, wobei der miR-122/Ago2-Komplex die stärkste Bindung zeigt ^[155; 200]. Die Funktionen der Target-Sequenzen in der HCV-5'-UTR sind sehr vielfältig. Nach Bindung der miR-122/Ago2-Komplexe kommt es zu einer erhöhten Translationsrate der viralen Proteine ^[153; 154; 194–197] und zu einer verstärkten RNA-Replikation ^[162; 191; 194]. Ebenso spielt die miR-122 eine sehr entscheidende Rolle bei der Stabilisierung der HCV-RNA ^[194; 199–203].

Die miR-122 bindet mit unterschiedlichen Affinitäten ^[194; 206; 214] an die beiden komplementären Sequenzen in der 5'-UTR, diese beiden Sequenzen scheinen jedoch gleichbedeutend für die Translation zu sein ^[194; 199].

Da bisher nur wenig über die individuellen Funktionen der miR-122-Erkennungssequenzen in der HCV-5'-UTR im viralen Replikationszyklus bekannt ist, sollten diese in der hier vorliegenden Arbeit genauer charakterisiert werden. Es sollte untersucht werden, ob eine der beiden Bindungsstellen bevorzugt von miR-122 adressiert wird und ob dabei ein additiver oder kooperativer Effekt auf die Stimulation der Translation ausgeübt wird. Darüber hinaus sollte bestimmt werden, inwieweit jede hybridisierte miR-122-Target-Sequenz in der 5'-UTR am Schutz vor nukleolytischem Abbau beteiligt ist.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen erstmals eine kooperative Anlagerung der miR-122/Ago2-Komplexe an die virale 5'-UTR, wobei der Komplex *in vivo* stärker an S1 bindet als an S2. Allerdings konnte in *in vitro*-Studien eine deutlich stärkere Hybridisierung der miR-122 an die zweite Erkennungssequenz der HCV-RNA nachgewiesen werden.

Die spezielle synergistische Interaktion der miR-122/Ago2-Komplexe führt zu einer kooperativen Stimulation der viralen Translation. Eine miR-122-abhängige Stabilisierung der HCV-RNA konnte nicht nachgewiesen werden. Dies bestätigt jedoch, dass der stimulierende Effekt auf die Proteinexpression direkt auf die Interaktion der HCV-RNA mit der miR-122 zurückzuführen ist und dieser nicht nur eine indirekte Folge des Schutzes der RNA vor exonukleolytischer Degradierung ist.

4.1 Separate Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-5'-UTR

Für die zwei hochkonservierten miR-122-Erkennungssequenzen in der HCV-5'-UTR existieren zahlreiche Studien, in denen diese gemeinsam adressiert und charakterisiert

wurden, jedoch nur wenige über den Grad der Beteiligung der jeweiligen Bindungsstelle. Bekannt ist, dass die erste Target-Sequenz S1 einen größeren Einfluss auf die Produktion infektiöser Viruspartikel hat ^[194], während für S2 eine erhöhte Stabilisierung der HCV-RNA postuliert wird ^[206].

In einigen Publikationen wurden die miR-122-Erkennungssequenzen teils separat teils gemeinsam mutiert (z.B. in ^[194; 199; 201; 214]). Die Analyse der Erkennung der mutierten Target-Sequenzen durch die artifiziellen miRNAs erfolgte dabei jedoch nur indirekt über die Auswirkung auf die Proteinexpression oder die Synthese und Stabilität der viralen RNA (Northern Blot).

Die im Rahmen dieser Arbeit entworfenen Mutationen in S1 bzw. S2 (Abbildung 3.3) wurden daher zunächst auf ihre spezifische und separate Adressierung mit den artifiziellen miRNAs überprüft. Dafür wurde die co-IP-Methode verwendet, welche im Rahmen der Dissertation von D. Conrad im Labor etabliert wurde und die Ago2-assoziierte Bindung von miR-122 an die HCV-RNA zeigt ^[155]. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung der miR-122m1/Ago2- und miR-122m2/Ago2-Komplexe gezielt an die jeweils mutierten Erkennungssequenzen S1m und S2m erfolgt (Abbildung 3.4). Dies konnte über die Adressierung der 5'-UTR mit den zu den Mutationen homologen LNAs bestätigt werden (Abbildung 3.5). Die Hybridisierung der wt-miR-122 an die HCV-RNA ist durch die Mutationen in den Target-Sequenzen unterbunden. Ebenso ist die Ago2-abhängige Bindung der mutierten miRNAs an die wt-Erkennungssequenzen durch die nicht-komplementären Nukleotide blockiert (Abbildung 3.4).

Zusammenfassend konnte somit eine separate und spezifische Adressierung der mutierten miR-122-Bindungsstellen und eine direkte physikalische Interaktion mit den artifiziellen miRNAs im Komplex mit Ago2 nachgewiesen werden.

4.1.1 Die Affinität des miR-122/Ago2-Komplexes ist *in vivo* zu S1 höher als zu S2

Während der co-IP-Bindungsstudien der mutierten miR-122-Bindungsstellen in der 5'-UTR mit den kompensierenden miRNAs wurde festgestellt, dass die Affinität des miR-122m1/Ago2-Komplexes zu S1m deutlich stärker war als die des miR-122m2/Ago2-Komplexes zu S2m (Abbildung 3.4). Dies konnte in wiederholten Experimenten durch die Quantifizierung der relativen Bindungsstärken sowohl für die Doppel- (S1mS2m-) (Abbildung 3.6) als auch für die Einzelmutante S1mS2 (Abbildung 3.19) bestätigt werden. Diese Beobachtungen könnten die bereits veröffentlichten Daten erklären, die besagen, dass die *in vivo*-Bindung der miR-122 an S1 einen größeren Einfluss auf den HCV-Lebenszyklus hat als die Hybridisierung an S2 ^[194; 201; 214]. Darüber hinaus deuten eigene Translationsstudien

auf eine stärkere virale Translationsrate nach Adressierung von miR-122 an S1 hin (Kapitel 4.2).

Eine mögliche Erklärung hierfür könnten die miRNA-Sequenzabschnitte sein, die im Komplex mit Ago2 bei der Erkennung einer mRNA-Zielsequenz beteiligt sind ^[215]. So sind bei der Bindung an die von Ago2-präsentierten Nukleotide 2–8 insgesamt 7 nt der Bindungsstelle S1 (ACACUCC) im Vergleich zu 6 nt (CACUCC) von S2 involviert. Trotz der eingefügten Mutationen ist der GC-Gehalt der wt- und mutierten RNA dabei gleich. Anders verhält es sich bei der Hybridisierungsreaktion von miR-122m1 an S1m im Vergleich zu miR-122 an S2. Dort weist die Mutante eine GC-Paarung weniger auf (Abbildung 3.16), dennoch konnte dort eine stärkere Bindung detektiert werden (Abbildung 3.19). Darüber hinaus sind an der Bindung des miRNA/Ago2-Komplexes die Nukleotide 13–16 der miRNA beteiligt ^[215], wobei das Nukleotid 13 der miR-122 für die Bindung an S1 nur eine geringe Rolle spielt ^[199; 201]. Die miR-122 und miR-122m2 hybridisieren demnach über die *seed*-Target-Sequenz hinaus mit 4 nt (2 x GC) von S2(m), während die miR-122m1 an nur 3 nt der S1m (1 x GC) bindet. In der wt-RNA erfolgt die Hybridisierung von miR-122 an nur 2 nt der S1 (2 x GC) (Abbildung 3.1), wodurch das zum Guanin-veränderte erste Nukleotid der HCV-Sequenz (Abbildung 3.3, Abbildung 3.16) die höhere Affinität von miR-122m1 an S1m in der Doppel- und Einzelmutante nicht erklären kann.

Die beim miR-122-Erkennungsmechanismus beteiligten Sequenzen scheinen demnach nicht ausschlaggebend für die erhöhte Affinität des miR-122/Ago2-Komplexes an S1 in der HCV-5'-UTR zu sein. Es wäre möglich, dass weitere Faktoren bei der Adressierung eine Rolle spielen, z.B. Proteine des miRNP-Komplexes oder aber weitere zelluläre oder virale Faktoren, welche die Affinität des miR-122/Ago2-Komplexes an seine Zielsequenzen beeinflussen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass es nach Bindung der 40S-Untereinheit an die HCV-IRES zu einer Strukturänderung in dieser Region kommt ^[216; 136]. Diese Veränderung könnte dann zu einer erhöhten Instabilität des miR-122/Ago2-Komplexes an S2 führen, wodurch der miR-122/Ago2-Komplex an S2 in der co-IP als weniger affin zu deuten wäre.

Aufgrund der Strukturänderung der HCV-RNA und der damit einhergehenden limitierten Zugänglichkeit der Bindungsstelle S1 in der S1S2m-Einzelmutante (Abbildung 3.18) konnte keine Aussage über die Affinität der separaten Bindung von miR-122 an S1 getroffen werden. Die kaum nachweisbare Bindung von miR-122 an S1 in dieser Mutante bestätigt jedoch, dass die Zugänglichkeit der Target-Sequenz eine überragende Wichtigkeit für die Bindung des Komplexes an seine Erkennungssequenzen besitzt. Die Abhängigkeit der Bindungseffizienz von der Zugänglichkeit der miRNA-Zielsequenzen konnte bereits für zelluläre mRNAs ^[217; 218] gezeigt werden, wie auch für die Bindung der miR-122 in der NS5B-kodierenden Sequenz und 3'-UTR der HCV-RNA (Dissertation N. Dünnes, 2016).

Das Modell, in dem die miR-122/Ago2-Komplexe mit unterschiedlichen Affinitäten an die Erkennungssequenzen in der 5'-UTR binden und die miR-122 an S1 einen entscheidenden Einfluss auf den HCV-Vermehrungszyklus hat, wird zusätzlich durch die Daten der Kooperationsstudien aus der co-IP (Abbildung 3.6, Abbildung 3.19, Kapitel 4.1.3) und dem Translationsassay (Abbildung 3.11, Abbildung 3.21, Kapitel 4.2) unterstützt.

4.1.2 *In vitro*-Studien zeigen eine stärkere Bindung von miR-122 an S2

Von Mortimer und Doudna wurde 2013 durch Struktur- und *in vitro*-Analysen von miR-122-Affinitäten eine stärkere Bindung von miR-122 an S2 gezeigt ^[206]. Die EMSA-Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit sprechen ebenso für eine stärkere Hybridisierung des aktiven miR-122-Strangs an S2 (Abbildung 3.7, Abbildung 3.8). Nach Inkubation von miR-122m1 mit der S1mS2m-HCV-5'-UTR konnte in nur einem von insgesamt sechs Experimenten ein *Shift* der viralen RNA detektiert werden (nicht gezeigt). Ein genereller Nachweis eines tri-molekularen Komplexes aus zwei Molekülen miRNA und einem Molekül HCV-RNA war nicht möglich (Abbildung 3.8). Auch für die wt-RNA konnte nur die Bindung einer Zielsequenz durch miR-122 gezeigt werden (Abbildung 3.7). Aufgrund der Studien mit der separat adressierbaren Doppelmutante ist anzunehmen, dass *in vitro* auch im Wildtyp die S2 von der miR-122 adressiert wird und eine Bindung an S1 ausbleibt. Für die in der co-IP verwendeten LNAs konnte eine ähnliche Affinität gezeigt werden. LNA_{m2} hybridisierte deutlich stärker an die virale RNA als LNA_{m1} (Abbildung 3.8), was allerdings auf die erhöhte Anzahl der an die S2-Sequenz hybridisierenden Nukleotide von LNA_{m2} zurückzuführen ist (Kapitel 2.1.3.2.1). Dies ist auch der Grund für die stärkere *in vitro*-Bindung der artifiziellen miRNA an S2(m) im Vergleich zur S1(m). Die Erkennungssequenz S1 in der 5'-UTR weist je nach Isolat eine bis zu 11 nt lange zur miR-122 komplementären Sequenz auf (Abbildung 3.1). Dagegen können in der Bindungsstelle S2 insgesamt maximal 12 nt von der miR-122 adressiert werden (Abbildung 3.1). Gleiches gilt für die artifiziellen miRNAs an S1m und S2m in der HCV-Doppelmutante (Abbildung 3.3), was die höhere Affinität der reinen miRNA für die zweite Erkennungssequenz erklärt.

Der Grund für die nicht nachweisbare Bindung von miR-122m1 bzw. LNA_{m1} an S1m ist vermutlich eine zu gering eingesetzte Menge der miRNA-Moleküle bei der Titration im EMSA. In den Studien von Mortimer und Doudna konnte eine Dissoziationskonstante (K_d) für die miR-122 an S2 von 90 nM *in vitro* über isothermale Titrations-Kalorimetrie ermittelt werden ^[206]. Für die Bindung von miR-122 an S1 war der Wert jedoch um das 10-fache größer. Das bedeutet, dass erst bei höheren Konzentrationen eine Bindung der miR-122 an S1 erfolgt. Mortimer und Doudna verwendeten 8 µM *in vitro*-transkribierte RNA ^[206], während in dieser Arbeit umgerechnet nur etwa 0,3 µM eingesetzt wurden. Dieser Umstand könnte

dazu geführt haben, dass die Konzentration der miR-122m1 zu gering war, um eine Komplexbildung mit der HCV-RNA nachweisen zu können. Um diese Theorie zu überprüfen, müssten größere Mengen nicht-radioaktiv markierte virale S1mS2m- und wt-RNA eingesetzt werden, wodurch damit einhergehend auch die Menge der artifiziellen miRNA über die molaren Verhältnisse erhöht werden müsste.

Dennoch zeigen diese generierten Daten, dass *in vitro* die zweite miR-122-Erkennungssequenz stärker gebunden wird. Der Unterschied zur co-IP, bei der eine stärkere Bindung von miR-122 an S1 detektiert wurde, ist, dass in den *in vitro*-Studien weder Ago2 noch weitere zelluläre Faktoren einen Einfluss auf die Bindung der miRNA an ihre Zielsequenz ausüben konnten. Dadurch sind keine direkten Rückschlüsse aus den Beobachtungen der EMSAs für die *in vivo*-Situation möglich.

4.1.3 Kooperative Bindung der miR-122/Ago2-Komplexe an die HCV-5'-UTR

Bisher wurde angenommen, dass beide miR-122-Moleküle gleichzeitig denselben HCV-RNA-Strang adressieren ^[191]. Es wurde allerdings bereits vermutet, dass eine Art „kooperative“ Interaktion zwischen den Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR existieren muss, da die Bindung von miR-122 an S1 allein nicht die HCV-Abundanz in infizierten Zellen erklären kann und der miR-122/S2-Komplex ebenso wichtig für die Genom-Akkumulation ist ^[191].

In den hier durchgeführten co-IP-Studien konnte durch die Quantifizierung der relativen Bindungsstärken der miRNAs an S1m und S2m erstmals eine kooperative Hybridisierung der miRNA/Ago2-Komplexe in der Doppelmutante gezeigt werden (Abbildung 3.6). Die Signalstärke der radioaktiv markierten HCV-5'-UTR war nach gemeinsamer Adressierung mit miR-122m1 und miR-122m2 etwa 1,5-fach höher als die addierten Werte nach separater Adressierung. Im Gegenteil dazu konnte jedoch für die Einzelmutante S1mS2 ein gegensätzlicher Effekt beobachtet werden (Abbildung 3.19). Der errechnete additive Wert war sogar doppelt so groß wie die quantifizierte Signalstärke nach gemeinsamer Adressierung.

Es stellt sich nun die Frage, welche Ursache für die widersprüchlichen Resultate vorliegt und ob eine kooperative Interaktion der miR-122/Ago2-Komplexe in der wt-HCV-5'-UTR existiert oder nicht? Es wäre möglich, dass die Affinität der artifiziellen miRNA/Ago2-Komplexe zu der S1mS2 höher ist, als in der S1mS2m. Zum einen ist an der Hybridisierungsreaktion von miR-122 an S2 eine GC-Paarung mehr beteiligt als zwischen miR-122m2 und S2m (Abbildung 3.16), und zum anderen könnte, unter Berücksichtigung einer kooperativen Interaktion zwischen den Komplexen, die verstärkte Bindung einer miRNA die der anderen induzieren. Aufgrund der stärkeren Grundsignale sowohl für die separat als auch die

gemeinsam co-präzipitierte S1mS2-HCV-5'-UTR wäre es möglich, dass die messbare absolute Differenz sehr klein und damit die Quantifizierung ungenau wurde, sodass dies zu falsch-negativen Aussagen führte. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse der Translationsstudien nahegelegt, in denen wiederum ein signifikant kooperativer Effekt nachweisbar war (Kapitel 4.2). Daher muss vermutet werden, dass im Falle der schwachen Bindung von miR-122 an S2 das Messsystem der co-IP quantitativ zu ungenau ist. Um eine mögliche fehlerhafte Auswertung zu ermitteln könnten die Experimente mit geringeren Mengen transfizierter HCV-RNA und miRNA-Duplexen wiederholt werden.

Auch wenn die für die Doppelmutante nachgewiesene kooperative Bindung der artifiziellen miRNA an die S1mS2-Mutante nochmals überprüft werden muss, ist vorläufig anzunehmen, dass es in der HCV-5'-UTR zu einer kooperativen Bindung beider miR-122/Ago2-Komplexe an die miR-122-Erkennungssequenzen kommt. Diese Hypothese wird durch eigene Studien und Daten aus Publikationen unterstützt ^[219–221]. Die kooperative Bindung der miRNA/Ago2-Komplexe scheint jedoch spezifisch für imperfekte Basenpaarungen zwischen miRNA und mRNA zu sein ^[222], wie es bereits für die Interaktion von miR-122 an die HCV-5'-UTR gezeigt werden konnte. Dies deutet auf einen spezifischen Mechanismus zur Unterstützung der Regulation der mRNA-Translation und damit auf eine funktionelle Bedeutung der miR-122/Ago2-Bindung auf den viralen Lebenszyklus hin.

4.2 Kooperative Stimulation der Translation nach gemeinsamer Adressierung der miR-122-Erkennungssequenzen in der HCV-5'-UTR

Seit Mitte der 90er Jahre ist bereits bekannt, dass die HCV-IRES nicht nur die Bindungsstelle des Translationsapparates darstellt, sondern aktiv bei der Initiation der viralen Proteinsynthese involviert ist ^[32; 127; 216; 223]. Es war jedoch lange Zeit nicht möglich, eine miR-122-abhängige Stimulation der IRES-vermittelten Translation nachzuweisen. Somit wurde angenommen, dass der Einfluss der miR-122 auf den HCV-Lebenszyklus auf die Stabilisierung des Genoms sowie die Replikation der RNA begrenzt ist ^[162; 191]. Erst später konnte eine gesteigerte virale Proteinexpression nach Bindung der miR-122 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden ^[153; 194–196]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte diese stimulierende Funktion der miR-122 nochmals bestätigt werden (Abbildung 3.10).

Viel wichtiger in der vorliegenden Arbeit war jedoch die Untersuchung der individuellen Funktion der einzelnen Erkennungssequenzen auf die Proteinexpression. So konnte eine kooperative Stimulation der Translation nach gemeinsamer Adressierung der miRNA-Bindungsstellen in allen HCV-Mutanten detektiert werden (Abbildung 3.11, Abbildung 3.21).

Während dieser Studien wurden Daten veröffentlicht, die ebenfalls einen miR-122-abhängigen kooperativen Effekt auf die virale Proteinexpression zeigen ^[214].

Die Adressierung der ersten miRNA-Zielsequenz (S1m) scheint an der HCV-Translation entscheidend beteiligt zu sein (Abbildung 3.11, Abbildung 3.21), was bereits durch eine stärkere Bindung des miR-122/Ago2-Komplexes an S1 in der co-IP vermutet wurde (Kapitel 4.1.1). Die Bedeutung der S1 für die Proteinexpression zeigt sich zudem indirekt durch die Ergebnisse für die S1S2m-Einzelmutante. So ist im Luciferase-Assay ein schwächerer Einfluss von S1 in der S1S2m-RNA im Vergleich zur S1m in der Einzel- bzw. Doppelmutante zu beobachten (Abbildung 3.21). Damit einhergehend zeigte sich in der vorliegenden Arbeit ebenso eine reduzierte kooperative Stimulation der Proteinexpression, was auf einen großen Einfluss der S1 bei der Interaktion der miRNP-Komplexe schließen lässt.

Für die S2 und die S2m in der jeweiligen HCV-RNA (S1mS2, S1m2m) konnte hingegen keine signifikante Stimulation der Translation beobachtet werden, wenn diese allein mit miR-122(m2) hybridisierten (Abbildung 3.11, Abbildung 3.21). Diese Ergebnisse korrelieren mit der in der co-IP gezeigten schwächeren Bindung des miRNA/Ago2-Komplexes an die zweite Erkennungssequenz in der 5'-UTR (Kapitel 4.1.1).

Interessanterweise konnte im Luciferase-Assay im Gegensatz zur co-IP sogar für die S1mS2-HCV-RNA eine kooperative Stimulation der viralen Translation beobachtet werden (Abbildung 3.21). Dieser Effekt ist vermutlich auf eine kooperative Interaktion der miR-122/Ago2-Komplexe zurückzuführen, was die Vermutung noch bestärkt, dass die co-IP-Ergebnisse für die S1mS2-HCV-RNA in Bezug auf die Kooperativität nicht maßgebend sind (Kapitel 4.1.3).

Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit produzierten Daten wurde nicht nur die miR-122-abhängige Stimulation der Translation und der deutlich größere Einfluss von S1 auf den HCV-Zyklus bestätigt, sondern erstmals, zusammen mit den Daten von Thibault *et al.* ^[214], ein kooperativer Effekt der miRNP-Komplexe auf die virale Proteinexpression gezeigt. Der miR-122-abhängige Effekt wurde dabei entgegen bisheriger Aussagen ^[200; 202; 214] nicht von der Stabilität der HCV-Genome beeinflusst (Abbildung 3.14) und zeigt damit klar einen direkten Einfluss der miR-122 auf die Proteinexpression. Dies konnte ebenso zuvor von Henke *et al.* gezeigt werden ^[153].

4.3 Einfluss der miR-122 auf die HCV-Genom-Stabilität

Bisher ist wenig bekannt über den Abbau der HCV-RNA in infizierten Zellen. Da die virale RNA eine positive Orientierung besitzt und somit funktionell gleichbedeutend einer mRNA ist, wird vermutet, dass die Degradierung des HCV-Genoms über zelluläre Abbauewege

erfolgt^[200; 202]. Der zytoplasmatische Abbau zellulärer mRNA beginnt normalerweise mit der Entfernung des 3'-poly(A)-Bereichs oder des 5'-Cap-Nukleotids, gefolgt von exonukleolytischem Abbau des RNA-Moleküls in entweder 5'-3'- oder 3'-5'-Orientierung^[224; 225]. Vom 5'-Ende baut beispielsweise die Exonuklease XRN1 die restliche Sequenz ab^[226]. Anders herum kann die mRNA auch vom 3'-Ende her durch den Exosomen-Komplex degradiert werden^[227].

Die HCV-RNA hingegen besitzt kein 5'-Cap und endet mit einer strukturreichen 3'-UTR, sodass die zellulären Mechanismen zur Entfernung des Cap-Nukleotids sowie des poly(A)-Bereichs keine Auswirkung auf die virale RNA-Stabilität haben sollten. Allerdings könnten beide Exonukleasen, XRN1 und der Exosomen-Komplex, am Abbau der HCV-RNA beteiligt sein.

Es liegen zahlreiche Studien vor, die sich mit der Stabilität des HCV-Genoms beschäftigt haben. So konnte nachgewiesen werden, dass die Bindung des miR-122/Ago2-Komplexes an die 5'-UTR von HCV zu einer erhöhten Stabilisierung der RNA führt^[200]. Ebenso konnte durch das Anfügen eines unmethylierten Guanosin-Caps an der 5'-UTR kein Unterschied in der Stabilität nach Adressierung mit miR-122 festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass der miR-122/Ago2-Komplex die virale RNA ähnlich wie ein Cap-Homolog physikalisch vor 5'-Exonuklease-Verdau schützt^[195; 200]. Darüber hinaus konnte ein direkter, negativer Einfluss von XRN1 auf die Abundanz der HCV-RNA nachgewiesen werden^[202; 214]. Da XRN1 jedoch nur monophosphorylierte 5'-Termini erkennt und die HCV-RNA ein 5'-Triphosphat besitzt^[202], wird vermutet, dass an diesem Abbau-Weg eine noch zu identifizierende Pyrophosphatase beteiligt ist^[202; 228].

Ein Effekt des Exosomen-Komplexes auf die HCV-RNA-Stabilität konnte *in vivo* nur minimal für transfizierte, nicht aber für eine infizierte HCV-RNA gezeigt werden^[202]. Somit deuten die bisherigen Studien alle auf einen direkten Schutz des HCV-Genoms vor 5'-Degradierung durch die miR-122/Ago2-Komplexe in der 5'-UTR hin.

Eine andere Rolle beim Schutz der HCV-RNA übernimmt die miR-122 bei der partiellen Blockierung von RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*), dem Schlüsselsensor für virale Infektionen^[229; 230]. Diese zytosolische Helikase wird durch virale RNAs aktiviert, die an ihrem 5'-Ende ein Triphosphat besitzen und ist in HCV-infizierten Schimpansen hochreguliert^[231]. Die Aktivität dieses Proteins wird durch den 3'-Überhang der miR-122 nach der Bindung an ihre Target-Sequenzen in der 5'-UTR unterbunden^[229; 230].

4.3.1 Die Gesamtstabilität und 5'-Integrität der HCV-IRES ist unabhängig von miR-122/Ago2-Komplexen

Im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen konnte der miR-122-abhängige Effekt auf die Stabilisierung der viralen RNA in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Weder nach separater noch gemeinsamer Adressierung der kompensierenden miRNAs an die mutierten miR-122-Target-Sequenzen war ein Unterschied zur Probe ohne miRNAs zu erkennen (Abbildung 3.14, Abbildung 3.15). Die Stabilität der viralen RNA blieb zudem bis zu 24 h p.e. nahezu unbeeinflusst. In verschiedenen Studien konnte hingegen ein sehr deutlicher Abbau der HCV-RNA innerhalb von 6 h beobachtet werden ^[200; 202].

Durch die Titration der radioaktiv markierten antisense-Sonde im RPA mit re-extrahierter cRNA, aus mit HCV-Reporter-RNA-transfizierten Zellen, sollte eine falsch-negative Detektion der Degradierung ausgeschlossen werden. Um zu überprüfen, dass die Sonde nicht der limitierende Faktor war, wurde testweise die zehnfache Menge (1 ng) der Sonde im RPA eingesetzt (Abbildung 3.13, Versuche nicht gezeigt). Die detektierte Gesamtmenge der viralen RNA blieb jedoch unbeeinflusst. Zudem war in den Experimenten von Shimakami *et al.* die Menge der HCV-RNA nach 6–9 h so stark reduziert ^[200], dass diese Unterschiede in meinen Experimenten auch bei sehr niedriger Sonden-Konzentration hätten sichtbar sein müssen.

Bei genauerer Betrachtung der verwendeten Systeme zur Bestimmung der viralen RNA-Stabilität fiel auf, dass die durchgeführten Studien von Li *et al.* und Shimakami *et al.* auf demselben Konstrukt basierten ^[200; 202]. Dieses besteht aus dem kompletten Genom (*full length*) des Genotyps 1a in welches eine GLuc2A-kodierende Sequenz eingefügt wurde. Mit Ausnahme von Studien, in denen eine Mengenreduktion von HCV-IRES-Sequenzen nach Inkubation mit rekombinantem XRN1 in Zell-freien Systemen gezeigt wurde ^[206; 232] konnte ein miR-122-abhängiger Schutz vor nukleolytischem Abbau in weiteren Experimenten nur für *full length*-HCV-Genome bestätigt werden ^[214]. Somit ist zu vermuten, dass entweder die RNA-Sequenzen im HCV-ORF oder aber die exprimierten viralen Proteine einen Einfluss auf den Kontrollmechanismus der HCV-RNA-Stabilität ausüben. Die ausbleibende Expression viraler Proteine in dem hier verwendeten Minimalkonstrukt könnte somit ausschlaggebend für die miR-122-unabhängige Stabilität der HCV-5'-UTR sein. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die am mRNA-*decapping*-Prozess beteiligten Proteine PatL1, LSM1 (Abbildung 1.10), DDX3 und DDX6 der *P-bodies* an der HCV-Translation und -Replikation beteiligt sind ^[194; 233; 234]. Diese werden an LDs rekrutiert und co-lokalisieren mit dem HCV-Core-Protein ^[235]. Somit wäre es möglich, dass in Studien, in denen *full length*-HCV-infizierte oder -transfizierte Zellen die HCV-Proteine exprimieren, diese die

Nuklease XRN1 zusammen mit den stimulierenden Proteinen der *P-bodies* ^[236] an das ER rekrutieren.

Auch wenn XRN1 ein zytosolisches Enzym ist ^[236] und somit die virale RNA unabhängig von den *P-bodies* hätte degradieren können, konnte bisher kein Unterschied in der zellulären Lokalisation von XRN1 in HCV-infizierten versus nicht-infizierten Zellen nachgewiesen werden ^[202]. Da ein Abbau durch zytosolisches XRN1 jedoch nicht auszuschließen ist, wäre es ebenso möglich, dass bestimmte virale Faktoren zur Aktivierung des Abbauprozesses gefehlt haben oder aber die Aktivierung einer bisher unbekannten Polyphosphatase zur Bildung eines 5'-Monophosphates für eine optimale XRN1-Aktivität ausblieb.

Zur Untersuchung der individuellen Funktion der miR-122-Erkennungssequenzen in der HCV-5'-UTR im Hinblick auf die Stabilisierung und 5'-Integrität der viralen RNA müssten die Versuche demnach mit *full length*-Konstrukten wiederholt werden. Es bleibt die Frage bestehen, ob der kooperative Effekt bei der Bindung der miR-122/Ago2-Komplexe und bei der Stimulation der viralen Translation auch in Stabilitätsstudien nachweisbar ist und/oder ob eine der beiden miR-122-Erkennungssequenzen einen größeren Einfluss auf die Stabilität der viralen RNA hat.

Abschließend lässt sich allerdings mithilfe der RPA-Ergebnisse feststellen, dass die oftmals in der Literatur beschriebenen stimulierenden Effekte der miR-122 auf die virale Translation im Rahmen dieser Arbeit nicht indirekt durch eine erhöhte Stabilität der HCV-RNA zustande kommen ^[200; 202; 214], sondern durch den direkten physiologischen Effekt der miR-122/Ago2-Komplexe auf die HCV-IRES.

4.4 Exkurs: Keine Überkreuz-Hybridisierung von miR-122 in der HCV-5'-UTR

Jopling *et al.* waren die ersten Autoren die zur miR-122-Sequenz komplementäre Regionen im HCV-Genom gesucht haben ^[162]. Sie konnten u.a. erstmals die hochkonservierten miR-122-Erkennungssequenzen in der HCV-5'-UTR detektieren und charakterisieren ^[162; 191]. Erst einige Jahre später wurde von Machlin *et al.* gezeigt, dass über einige interne Nukleotide der miR-122 hinaus auch die weiter 3'-orientierten Nukleotide absolut wichtig für die HCV-Abundanz sind ^[199]. Auf der Basis von Mutationsstudien wurde 2014 auf dem „21. internationalen Symposium über HCV und ähnliche Viren“ von Thibault und Wilson die Hypothese aufgestellt, dass die miR-122-Moleküle möglicherweise darüber hinaus eine Überkreuz-Bindung in der 5'-UTR eingehen können. Dabei sollen die weiter 3'-orientierten hybridisierenden Nukleotide an den entsprechenden Sequenzabschnitt der anderen Zielsequenz binden (Abbildung 3.22).

Bei der Überprüfung dieser Hypothese konnte weder in der co-IP (Abbildung 3.23) noch im EMSA (Abbildung 3.24) eine Bindung der *Cross-over*-miRNAs an die HCV-5'-UTR

nachgewiesen werden. Aufgrund des einzelsträngigen Bereichs zwischen SLI und SLII in der IRES wäre eine strukturelle Annäherung der ersten 4 nt der 5'-UTR zur Kernsequenz der S2m und dadurch eine Adressierung von miR-122m2x im Komplex mit Ago2 an die HCV-RNA möglich gewesen (Abbildung 3.22). In der co-IP konnte dafür eine leichte Bande für die co-präzipitierte HCV-RNA detektiert werden (Abbildung 3.23). Da diese jedoch mit den Intensitäten der Negativkontrollen übereinstimmt, ist anzunehmen, dass es zu keiner spezifischen *Cross-over*-Bindung von miR-122 kommt. Gleiches konnte für die miR-122m1x in der HCV-Doppelmutante beobachtet werden. Da hier jedoch die miRNA einen Schlaufe bilden muss, um mit den weiter 3'-orientierten Nukleotiden an den weiter 5'-gelegenen komplementären Bereich von S2m binden zu können, war eine ausbleibende Co-Präzipitation der viralen RNA zu vermuten. Die Adressierung der miRNA über Ago2 erfolgt nach einem spezifischen Mechanismus der eine derartige „Beugung“ der miRNA nicht zulässt ^[215]. Allerdings konnte bereits für die miR-122m2x gezeigt werden, dass eine Überkreuz-Adressierung in der 5'-UTR nicht vorkommt, sodass auch bei einer Optimierung der miR-122m1x-Sequenz keine entsprechende Hybridisierung zu erwarten ist. Zudem konnte bisher auch keine Überkreuz-Bindung von miRNAs an zelluläre mRNAs gezeigt werden, im Gegensatz zu bereits beschriebenen perfekten und imperfekten Hybridisierungen (Abbildung 1.11). Dies deutet darauf hin, dass, auch wenn ein derartiger miRNA/mRNA-Komplex existieren sollte, dieser entweder sehr selten vorkommt oder aber durch seine geringe Stabilität nicht nachweisbar ist und dadurch für den HCV-Lebenszyklus irrelevant.

4.5 Modell der individuellen Funktion der miR-122-Erkennungssequenzen in der HCV-5'-UTR und weiterführende Versuche

Basierend auf den in dieser Arbeit präsentierten Daten ist im Zusammenhang mit der bereits diskutierten Literatur anzunehmen, dass die miR-122/Ago2-Komplexe in der HCV-5'-UTR miteinander kooperativ interagieren. Dabei wird möglicherweise ein Komplex an eine der Target-Sequenzen zuerst adressiert, was eine verstärkte Rekrutierung der miR-122 an die andere Bindungsstelle zur Folge hat. Der kooperative Effekt wirkt sich nachfolgend auf die virale Translation aus. Dabei kommt es allerdings wegen der verschiedenen Affinitäten der beiden Bindungsstellen zu einer unterschiedlichen Bedeutung der Erkennungssequenzen für die Translation und HCV-Akkumulation. So konnte gezeigt werden, dass bei der kooperativen Interaktion der miR-122/Ago2-Komplexe die S1 stärker an der Proteinexpression beteiligt ist als S2. Ein ähnlicher Einfluss beider miR-122-Erkennungssequenzen konnte für die Replikation bereits gezeigt werden ^[194; 214]. Beide

Zielsequenzen sind jedoch bei der Ausübung des kooperativen Effekts für den HCV-Zyklus absolut notwendig, sodass der funktionelle Ausfall einer Sequenz eine starke negative Auswirkung auf die Akkumulation hat.

Eine Aussage über die individuelle Beteiligung der miR-122-Zielsequenzen auf die Stabilität der HCV-RNA war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Ein kooperativ-stabilisierender Effekt und eine stärkere maskierende Funktion des miR-122/Ago2-Komplexes an der direkt am 5'-Ende vom HCV-Genom befindlichen S1 ist jedoch auch hier zu vermuten ^[195; 200; 201].

Darüber hinaus hat das Virus offensichtlich einen Mechanismus entwickelt, um die virale RNA vor exonukleolytischem Abbau zu schützen und zeitgleich die eigene Translations- und Replikationsrate zu optimieren, obwohl bei der Rekrutierung zellulärer Proteine an den Ort der HCV-Replikation vielleicht unerwünschter Weise auch die Exonuklease XRN1 mit rekrutiert wird.

Zukünftig ist von Interesse, welche weiteren Proteine im miRNP-Komplex an der Interaktion von miR-122 mit der HCV-5'-UTR beteiligt sind, welche Funktionen diese erfüllen und ob sich die miRNP-Komplexe an beiden miR-122-Erkennungssequenzen sogar voneinander unterscheiden. Zur Untersuchung der an der HCV-IRES befindlichen Proteine wurde bereits das S1-Aptamer-enhaltende HCV-Plasmid hergestellt (Anhang 6.1.3), getestet und modifiziert (nicht gezeigt). Aufgrund einer zu schwachen Re-Extraktion der viralen RNA *in vitro* und der limitierten Zeit wurde dieses System nicht weiter optimiert. Es gilt in zukünftigen Projekten andere Aptamere zu finden, z.B. PC-Linker (*photocleavable linker*), die eine Isolierung der HCV-RNA zusammen mit gebundenen Proteinen erlauben, um eine Identifikation der zellulären Faktoren in Abhängigkeit der miR-122 zu ermöglichen.

5 Literaturverzeichnis

- 1 **Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV.** (1975): Transfusion-Associated Hepatitis Not Due to Viral Hepatitis Type A or B. *N Engl J Med*, 292:767-770.
- 2 **Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M.** (1989): Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244(4902):359-62.
- 3 **World Health Organization** (2016): Guidelines for the screening, care and treatment of persons with chronic hepatitis C infection.
- 4 **Hoofnagle JH.** (2002): Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology*, 36(5 Suppl 1):S21-9.
- 5 **Jeong SW, Jang JY, Chung RT.** (2012): Hepatitis C virus and hepatocarcinogenesis. *Clin Mol Hepatol*, 18(4): 347–356.
- 6 **Lavanchy D.** (2011): Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol*, 17:107–115.
- 7 **Bukh J.** (1995): Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes *Semin Liver Dis*, 15:41-63.
- 8 **Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, Pilot-Matias TJ, Dawson GJ, Erker JC, Chalmers ML, Schlauder GG, Desai SM, Mushahwar IK.** (1995): Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *J Virol*, 69(9):5621-30.
- 9 **Simmonds P, Mellor J, Sakuldamrongpanich T, Nuchaprayoon C, Tanprasert S, Holmes EC, Smith DB.** (1996): Evolutionary analysis of variants of hepatitis C virus found in South-East Asia: comparison with classifications based upon sequence similarity. *J Gen Virol*, 77(Pt 12):3013-24.
- 10 **Brock KV, Deng R, Riblet SM.** (1992): Nucleotide sequencing of 5' and 3' termini of bovine viral diarrhea virus by RNA ligation and PCR. *J Virol Methods*, 38(1):39-46.
- 11 **Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A.** (1992): Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol*, 66(3):1476-83.
- 12 **Rice CM, Aebersold R, Teplow DB, Pata J, Bell JR, Vorndam AV, Trent DW, Brandriss MW, Schlesinger JJ, Strauss JH.** (1986): Partial N-terminal amino acid sequences of three nonstructural proteins of two flaviviruses. *Virology*, 151(1):1-9.
- 13 **Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM.** (1990): Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol*, 44:649-88.
- 14 **Simmonds P, Becher P, Collett MS, Gould EA, Heinz FX, Meyers G, Monath T, Pletnev A, Rice CM.** (2011): Flaviviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (eds) *Virus taxonomy*. Elsevier, Oxford, pp 1003–1020.

- 15 **Murphy DG, Sablonb E, Chamberlanda J, Fourniera E, Dandavinoc R und Tremblaya CL.** (2015): Hepatitis C Virus Genotype 7, a New Genotype Originating from Central Africa *J Clin Microbiol*, 53(3):967-972.
- 16 **Zein NN.** (2000): Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev*, 13(2):223-35.
- 17 **Takamizawa A, Mori C, Fuke I, Manabe S, Murakami S, Fujita J, Onishi E, Andoh T, Yoshida I, Okayama H.** (1991): Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol*, 65(3):1105-13.
- 18 **Catanese MT, Uryu K, Kopp M, Edwards TJ, Andrus L, Rice WJ, Silvestry M, Kuhn RJ, Rice CM.** (2013): Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(23):9505-10.
- 19 **Bartenschlager R, Frese M, Pietschmann T.** (2004): Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res*, 63:71-180.
- 20 **Nielsen SU, Bassendine MF, Burt AD, Martin C, Pumeechokchai W, Toms GL.** (2006): Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *J Virol*, 80(5):2418-28.
- 21 **André P, Komurian-Pradel F, Deforges S, Perret M, Berland JL, Sodoyer M, Pol S, Bréchet C, Paranhos-Baccalà G, Lotteau V.** (2002): Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol*, 76(14):6919-28.
- 22 **Chang KS, Jiang, J, Cai Z, Luo G.** (2007): Human apolipoprotein E is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol*, 81:13783–13793.
- 23 **Meunier JC, Russell RS, Engle R.E, Faulk KN, Purcell RH, Emerson SU.** (2008): Lipoprotein C1 association with hepatitis C virus. *J Virol*, 82:9647-9656.
- 24 **Bassendine MF, Sheridan DA, Bridge SH, Felmlee DJ, Neely RD.** (2013): Lipids and HCV. *Semin Immunopathol*, 35(1):87-100.
- 25 **Bankwitz D, Steinmann E, Bitzegeio J, Ciesek S, Friesland M, Herrmann E, Zeisel MB, Baumert TF, Keck ZY, Fong SK, Pécheur EI, Pietschmann T.** (2010): Hepatitis C virus hypervariable region 1 modulates receptor interactions, conceals the CD81 binding site, and protects conserved neutralizing epitopes. *J Virol*, 84(11):5751-63.
- 26 **Dreux M, Pietschmann T, Granier C, Voisset C, Ricard-Blum S, Mangeot PE, Keck Z, Fong S, Vu-Dac N, Dubuisson J, Bartenschlager R, Lavillette D, Cosset FL.** (2006): High density lipoprotein inhibits hepatitis C virus-neutralizing antibodies by stimulating cell entry via activation of the scavenger receptor BI. *J Biol Chem*, 281(27):18285-95.
- 27 **Popescu CI, Riva L, Vlaicu O, Farhat R, Rouillé Y, Dubuisson J.** (2014): Hepatitis C Virus Life Cycle and Lipid Metabolism. *Biology (Basel)*, 3(4): 892–921.

-
- 28 **Brown EA, Zhang H, Ping LH, Lemon SM.** (1992): Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res*, 20(19):5041-5.
- 29 **Wang C, Le SY, Ali N, Siddiqui A.** (1995): An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region. *RNA*, 1(5):526-37.
- 30 **Friebe P, Lohmann V, Krieger N, Bartenschlager R.** (2001): Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol*, 75(24):12047-57.
- 31 **El-Hage N, Luo G.** (2003): Replication of hepatitis C virus RNA occurs in a membrane-bound replication complex containing nonstructural viral proteins and RNA. *J Gen Virol*, 84: 2761-2769.
- 32 **Honda M, Brown EA, Lemon SM.** (1996): Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *RNA*, 2(10):955-68.
- 33 **Ji H, Fraser CS, Yu Y, Leary J, Doudna JA.** (2004): Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(49):16990-5.
- 34 **Otto GA, Puglisi JD.** (2004): The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell*, 119(3):369-80.
- 35 **Fricke M, Dünnes N, Zayas M, Bartenschlager R, Niepmann M, Marz M.** (2015): Conserved RNA secondary structures and long-range interactions in hepatitis C viruses. *RNA*, 21(7):1219-32.
- 36 **Tanaka T, Kato N, Cho MJ, Sugiyama K, Shimotohno K.** (1996): Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol*, 70(5):3307-12.
- 37 **Lohmann V.** (2013): Hepatitis C virus RNA replication. *Curr Top Microbiol Immunol*, 369:167-98.
- 38 **Blight KJ, Rice CM.** (1997): Secondary structure determination of the conserved 98-base sequence at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol*, 71(10):7345-52.
- 39 **Friebe P, Bartenschlager R.** (2002): Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol*, 76(11):5326-38.
- 40 **You S, Rice CM.** (2008): 3' RNA elements in hepatitis C virus replication: kissing partners and long poly(U). *J Virol*, 82(1):184-95.
-

-
- 41 **Ivanyi-Nagy R, Kanevsky I, Gabus C, Lavergne JP, Ficheux D, Penin F, Fossé P, Darlix JL.** (2006): Analysis of hepatitis C virus RNA dimerization and core-RNA interactions. *Nucleic Acids Res*, 34(9):2618-33.
- 42 **Shetty S, Kim S, Shimakami T, Lemon SM, Mihailescu MR.** (2010): Hepatitis C virus genomic RNA dimerization is mediated via a kissing complex intermediate. *RNA*, 16(5): 913–925.
- 43 **Bradrick SS, Walters RW, Gromeier M.** (2006): The hepatitis C virus 3'-untranslated region or a poly(A) tract promote efficient translation subsequent to the initiation phase. *Nucleic Acids Res*, 34(4):1293-303.
- 44 **Song Y, Friebe P, Tzima E, Jünemann C, Bartenschlager R, Niepmann M.** (2006): The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *J Virol*, 80(23):11579-88.
- 45 **You S, Stump DD, Branch AD, Rice CM.** (2004): A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*, 78(3):1352-66.
- 46 **Lee H, Shin H, Wimmer E, Paul AV.** (2004): cis-acting RNA signals in the NS5B C-terminal coding sequence of the hepatitis C virus genome. *J Virol*, 78(20):10865-77.
- 47 **Friebe P, Boudet J, Simorre JP, Bartenschlager R.** (2005): Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *J Virol*, 79(1):380-92.
- 48 **Diviney S, Tuplin A, Struthers M, Armstrong V, Elliott RM, Simmonds P, Evans DJ.** (2008): A hepatitis C virus cis-acting replication element forms a long-range RNA-RNA interaction with upstream RNA sequences in NS5B. *J Virol*, 82(18):9008-22.
- 49 **Romero-López C, Berzal-Herranz A.** (2009): A long-range RNA-RNA interaction between the 5' and 3' ends of the HCV genome. *RNA*, 15(9):1740-52.
- 50 **Tuplin A, Struthers M, Simmonds P, Evans DJ.** (2012): A twist in the tail: SHAPE mapping of long-range interactions and structural rearrangements of RNA elements involved in HCV replication. *Nucleic Acids Res*, 40(14):6908-21.
- 51 **Niepmann M.** (2013): Hepatitis C virus RNA translation. *Curr Top Microbiol Immunol*, 369:143-66.
- 52 **Moradpour D, Penin F.** (2013): Hepatitis C virus proteins: from structure to function. *Curr Top Microbiol Immunol*, 369:113-42.
- 53 **Boulant S, Vanbelle C, Ebel C, Penin F, Lavergne JP.** (2005): Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *J Virol*, 79(17):11353-65.
-

-
- 54 **Cristofari G, Ivanyi-Nagy R, Gabus C, Boulant S, Lavergne JP, Penin F, Darlix JL.** (2004): The hepatitis C virus Core protein is a potent nucleic acid chaperone that directs dimerization of the viral (+) strand RNA in vitro. *Nucleic Acids Res*, 32(8):2623-31.
- 55 **Boulant S, Targett-Adams P, McLauchlan J.** (2007): Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. *J Gen Virol*, 88(Pt 8):2204-13.
- 56 **Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K.** (2007): The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol*, 9(9):1089-97.
- 57 **Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Murayama A, Date T, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T.** (2008): Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J Virol*, 82(16):7964-76.
- 58 **Moradpour D, Penin F, Rice CM.** (2007): Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol*, 5(6):453-63.
- 59 **Rosa D, Campagnoli S, Moretto C, Guenzi E, Cousens L, Chin M, Dong C, Weiner AJ, Lau JY, Choo QL, Chien D, Pileri P, Houghton M, Abrignani S.** (1996): A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(5):1759-63.
- 60 **Garry RF, Dash S.** (2003): Proteomics computational analyses suggest that hepatitis C virus E1 and pestivirus E2 envelope glycoproteins are truncated class II fusion proteins. *Virol*, 307(2):255-65.
- 61 **Vieyres G, Thomas X, Descamps V, Duverlie G, Patel AH, Dubuisson J.** (2010): Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus. *J Virol*, 84(19):10159-68.
- 62 **Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, Worsfold O, Evans SD, Jaeger J, Harris MP, Rowlands DJ.** (2003): The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett*, 535(1-3):34-8.
- 63 **Chandler DE, Penin F, Schulten K, Chipot C.** (2012): The p7 protein of hepatitis C virus forms structurally plastic, minimalist ion channels. *PLoS Comput Biol*, 8(9):e1002702.
- 64 **Jirasko V, Montserret R, Lee JY, Gouttenoire J, Moradpour D, Penin F, Bartenschlager R.** (2010): Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly. *PLoS Pathog*, 6(12):e1001233.
-

-
- 65 **Boson B, Granio O, Bartenschlager R, Cosset FL.** (2011): A concerted action of hepatitis C virus p7 and nonstructural protein 2 regulates core localization at the endoplasmic reticulum and virus assembly. *PLoS Pathog*, 7(7):e1002144.
- 66 **Popescu CI, Callens N, Trinel D, Roingeard P, Moradpour D, Descamps V, Duverlie G, Penin F, Héliot L, Rouillé Y, Dubuisson J.** (2011): NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS Pathog*, 7(2):e1001278.
- 67 **Stapleford KA, Lindenbach BD.** (2011): Hepatitis C virus NS2 coordinates virus particle assembly through physical interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzyme complexes. *J Virol*, 85(4):1706-17.
- 68 **Lohmann V, Körner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R.** (1999): Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, 285(5424):110-3.
- 69 **Schregel V, Jacobi S, Penin F, Tautz N.** (2009): Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(13):5342-7.
- 70 **Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Mous J, Jacobsen H.** (1993): Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *J Virol*, 67(7):3835-44.
- 71 **Gwack Y, Kim DW, Han JH, Choe J.** (1996): Characterization of RNA binding activity and RNA helicase activity of the hepatitis C virus NS3 protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 225(2):654-9.
- 72 **Egger D, Wölk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K.** (2002): Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol*, 76(12):5974-84.
- 73 **Gosert R, Egger D, Lohmann V, Bartenschlager R, Blum HE, Bienz K, Moradpour D.** (2003): Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol*, 77(9):5487-92.
- 74 **Einav S, Sklan EH, Moon HM, Gehrig E, Liu P, Hao Y, Lowe AW, Glenn JS.** (2008): The nucleotide binding motif of hepatitis C virus NS4B can mediate cellular transformation and tumor formation without Ha-ras co-transfection. *Hepatology*, 47(3):827-35.
- 75 **Einav S, Elazar M, Danieli T, Glenn JS.** (2004): A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *J Virol*, 78(20):11288-95.
- 76 **Jones DM, Patel AH, Targett-Adams P, McLauchlan J.** (2009): The hepatitis C virus NS4B protein can trans-complement viral RNA replication and modulates production of infectious virus. *J Virol*, 83(5):2163-77.
-

-
- 77 **Li K, Lemon SM.** (2013): Innate immune responses in hepatitis C virus infection. *Semin Immunopathol*, 35(1):53-72.
- 78 **Appel N, Zayas M, Miller S, Krijnse-Locker J, Schaller T, Friebe P, Kallis S, Engel U, Bartenschlager R.** (2008): Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog*, 4(3):e1000035.
- 79 **Tellinghuisen TL, Foss KL, Treadaway J.** (2008): Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog*, 4(3):e1000032.
- 80 **Behrens SE, Tomei L, De Francesco R.** (1996): Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J*, 15(1):12-22.
- 81 **Lohmann V, Körner F, Herian U, Bartenschlager R.** (1997): Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J Virol*, 71(11):8416-28.
- 82 **Jin Z, Leveque V, Ma H, Johnson KA, Klumpp K.** (2012): Assembly, purification, and pre-steady-state kinetic analysis of active RNA-dependent RNA polymerase elongation complex. *J Biol Chem*, 287(13):10674-83.
- 83 **Schmidt-Mende J, Bieck E, Hugle T, Penin F, Rice CM, Blum HE, Moradpour D.** (2001): Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem*, 276(47):44052-63.
- 84 **Moradpour D, Brass V, Bieck E, Friebe P, Gosert R, Blum HE, Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V.** (2004): Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*, 78(23):13278-84.
- 85 **Cocquerel L, Voisset C, Dubuisson J.** (2006): Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J Gen Virol*, 87(Pt 5):1075-84.
- 86 **Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Kräusslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ.** (2005): Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*, 11(7):791-6.
- 87 **Ploss A, Rice CM.** (2009): Towards a small animal model for hepatitis C. *EMBO Rep*, 10(11):1220-7.
- 88 **Wünschmann S, Medh JD, Klinzmann D, Schmidt WN, Stapleton JT.** (2000): Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *J Virol*, 74(21):10055-62.
- 89 **Molina S, Castet V, Fournier-Wirth C, Pichard-Garcia L, Avner R, Harats D, Roitelman J, Barbaras R, Graber P, Ghersa P, Smolarsky M, Funaro A, Malavasi F, Larrey D, Coste J, Fabre JM, Sa-Cunha A, Maurel P.** (2007): The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *J Hepatol*, 46(3):411-9.
-

-
- 90 **Barth H, Schafer C, Adah MI, Zhang F, Linhardt RJ, Toyoda H, Kinoshita-Toyoda A, Toida T, Van Kuppevelt TH, Depla E, Von Weizsacker F, Blum HE, Baumert TF.** (2003): Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem*, 278(42):41003-12.
- 91 **Burlone ME, Budkowska A.** (2009): Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *J Gen Virol*, 90(Pt 5):1055-70.
- 92 **Molina S, Castet V, Pichard-Garcia L, Wychowski C, Meurs E, Pascussi JM, Sureau C, Fabre JM, Sacunha A, Larrey D, Dubuisson J, Coste J, McKeating J, Maurel P, Fournier-Wirth C.** (2008): Serum-derived hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes is tetraspanin CD81 dependent. *J Virol*, 82(1):569-74.
- 93 **Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A.** (2002): The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J*, 21(19):5017-25.
- 94 **Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M.** (1996): Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*, 271(5248):518-20.
- 95 **Koutsoudakis G, Herrmann E, Kallis S, Bartenschlager R, Pietschmann T.** (2007): The level of CD81 cell surface expression is a key determinant for productive entry of hepatitis C virus into host cells. *J Virol*, 81(2):588-98.
- 96 **Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Miyamoto M, Kaga M, Barth H, Baumert TF, Dubuisson J, Wakita T.** (2007): CD81 expression is important for the permissiveness of Huh7 cell clones for heterogeneous hepatitis C virus infection. *J Virol*, 81(10):5036-45.
- 97 **Grove J, Huby T, Stamatakis Z, Vanwolleghem T, Meuleman P, Farquhar M, Schwarz A, Moreau M, Owen JS, Leroux-Roels G, Balfe P, McKeating JA.** (2007): Scavenger receptor BI and BII expression levels modulate hepatitis C virus infectivity. *J Virol*, 81(7):3162-9.
- 98 **Liu S, Yang W, Shen L, Turner JR, Coyne CB, Wang T.** (2009): Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol*, 83(4):2011-4.
- 99 **Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, Rouillé Y.** (2006): Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*, 80(14):6964-72.
- 100 **Haid S, Pietschmann T, Pécheur EI.** (2009): Low pH-dependent hepatitis C virus membrane fusion depends on E2 integrity, target lipid composition, and density of virus particles. *J Biol Chem*, 284(26):17657-67.
-

-
- 101 **Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, Walther P, Fuller SD, Antony C, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R.** (2009): Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe*, 5(4):365-75.
- 102 **Quinkert D, Bartenschlager R, Lohmann V.** (2005): Quantitative analysis of the hepatitis C virus replication complex. *J Virol*, 79(21):13594-605.
- 103 **Shimoike T, Mimori S, Tani H, Matsuura Y, Miyamura T.** (1999): Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *J Virol*, 73(12):9718-25.
- 104 **McLauchlan J, Lemberg MK, Hope G, Martoglio B.** (2002): Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J*, 21(15):3980-8.
- 105 **Boulant S, Montserret R, Hope RG, Ratniner M, Targett-Adams P, Lavergne JP, Penin F, McLauchlan J.** (2006): Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J Biol Chem*, 281(31):22236-47.
- 106 **Coller KE, Heaton NS, Berger KL, Cooper JD, Saunders JL, Randall G.** (2012): Molecular determinants and dynamics of hepatitis C virus secretion. *PLoS Pathog*, 8(1):e1002466.
- 107 **Lindenbach BD.** (2013): Virion assembly and release. *Curr Top Microbiol Immunol*, 369:199-218.
- 108 **Benga WJ, Krieger SE, Dimitrova M, Zeisel MB, Parnot M, Lupberger J, Hildt E, Luo G, McLauchlan J, Baumert TF, Schuster C.** (2010): Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology*, 51(1):43-53.
- 109 **Mousseau G, Kota S, Takahashi V, Frick DN, Strosberg AD.** (2011): Dimerization-driven interaction of hepatitis C virus core protein with NS3 helicase. *J Gen Virol*, 92(Pt 1):101-11.
- 110 **Gastaminza P, Cheng G, Wieland S, Zhong J, Liao W, Chisari FV.** (2008): Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol*, 82(5):2120-9.
- 111 **Wozniak AL, Griffin S, Rowlands D, Harris M, Yi M, Lemon SM, Weinman SA.** (2010): Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production. *PLoS Pathog*, 6(9):e1001087.
- 112 **Timpe JM, Stamatakis Z, Jennings A, Hu K, Farquhar MJ, Harris HJ, Schwarz A, Desombere I, Roels GL, Balfe P, McKeating JA.** (2008): Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology*, 47(1):17-24.
-

-
- 113 **Witteveldt J, Evans MJ, Bitzegeio J, Koutsoudakis G, Owsianka AM, Angus AG, Keck ZY, Fong SK, Pietschmann T, Rice CM, Patel AH.** (2009): CD81 is dispensable for hepatitis C virus cell-to-cell transmission in hepatoma cells. *J Gen Virol*, 90(Pt 1):48-58.
- 114 **Gunnery S, Mathews MB.** (1993): Functional mRNA can be generated by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol*, 15(7):3597-607.
- 115 **Jackson RJ, Standart N.** (1990): Do the poly(A) tail and 3' untranslated region control mRNA translation? *Cell*, 62(1):15-24.
- 116 **Knapinska AM, Irizarry-Barreto P, Adusumalli S, Androulakis I, Brewer G.** (2005): Molecular Mechanisms Regulating mRNA Stability: Physiological and Pathological Significance. *Current Genomics*, 471-486(16).
- 117 **Pelletier J, Sonenberg N.** (1988): Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*, 334(6180):320-5.
- 118 **Jang SK, Pestova TV, Hellen CU, Witherell GW, Wimmer E.** (1990): Cap-independent translation of picornavirus RNAs: structure and function of the internal ribosomal entry site. *Enzyme*, 44(1-4):292-309.
- 119 **Niepmann M.** (2009): Internal translation initiation of picornaviruses and hepatitis C virus. *Biochem Biophys Acta*, 1789(9-10):529-41.
- 120 **López-Lastra M, Rivas A, Barriá MI.** (2005): Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biol Res*, 38(2-3):121-46.
- 121 **Mokrejs M, Vopálenský V, Kolenaty O, Masek T, Feketová Z, Sekyrová P, Skaloudová B, Kríz V, Pospíšek M.** (2006): IRESite: the database of experimentally verified IRES structures (www.iresite.org). *Nucleic Acids Res*, 34(Database issue):D125-30.
- 122 **Hinnebusch AG.** (2000): Mechanism and Regulation of Initiator Methionyl-tRNA Binding to Ribosomes. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, DOI: 10.1101/087969618.39.185.
- 123 **Hinnebusch AG.** (2006): eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends Biochem Sci*, 31(10):553-62.
- 124 **Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV.** (2010): The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(2):113-27.
- 125 **Korneeva NL, Lamphear BJ, Hennigan FL, Rhoads RE.** (2000): Mutually cooperative binding of eukaryotic translation initiation factor (eIF) 3 and eIF4A to human eIF4G-1. *J Biol Chem*, 275(52):41369-76.
- 126 **Eliseeva IA, Lyabin DN, Ovchinnikov LP.** (2013): Poly(A)-binding proteins: structure, domain organization, and activity regulation. *Biochemistry (Mosc.)*, 78(13):1377-91.
-

- 127 **Fraser CS, Doudna JA.** (2007): Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. *Nat Rev Microbiol*, 5(1):29-38.
- 128 **Pestova TV, Kolupaeva VG.** (2002): The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev*, 16(22):2906-22.
- 129 **Marintchev A, Edmonds KA, Marintcheva B, Hendrickson E, Oberer M, Suzuki C, Herdy B, Sonenberg N, Wagner G.** (2009): Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation. *Cell*, 136(3):447-60.
- 130 **Pestova TV, Shatsky IN, Fletcher SP, Jackson RJ, Hellen CU.** (1998a): A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev*, 12(1):67-83.
- 131 **Paulin FE, Campbell LE, O'Brien K, Loughlin J, Proud CG.** (2001): Eukaryotic translation initiation factor 5 (eIF5) acts as a classical GTPase-activator protein. *Curr Biol*, 11(1):55-9.
- 132 **Unbehaun A, Borukhov SI, Hellen CU, Pestova TV.** (2004): Release of initiation factors from 48S complexes during ribosomal subunit joining and the link between establishment of codon-anticodon base-pairing and hydrolysis of eIF2-bound GTP. *Genes Dev*, 18(24):3078-93.
- 133 **Kieft JS, Zhou K, Jubin R, Doudna JA.** (2001): Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA. *RNA*, 7(2):194-206.
- 134 **Kieft JS, Zhou K, Grech A, Jubin R, Doudna JA.** (2002): Crystal structure of an RNA tertiary domain essential to HCV IRES-mediated translation initiation. *Nat Struct Biol*, 9(5):370-4.
- 135 **Berry KE, Waghray S, Mortimer SA, Bai Y, Doudna JA.** (2011): Crystal structure of the HCV IRES central domain reveals strategy for start-codon positioning. *Structure*, 19(10):1456-66.
- 136 **Spahn CM, Kieft JS, Grassucci RA, Penczek PA, Zhou K, Doudna JA, Frank J.** (2001): Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science*, 291(5510):1959-62.
- 137 **Buratti E, Tisminetzky S, Zotti M, Baralle FE.** (1998): Functional analysis of the interaction between HCV 5'UTR and putative subunits of eukaryotic translation initiation factor eIF3. *Nucleic Acids Res*, 26(13):3179-87.
- 138 **Weinlich S, Hüttelmaier S, Schierhorn A, Behrens SE, Ostareck-Lederer A, Ostareck DH.** (2009): IGF2BP1 enhances HCV IRES-mediated translation initiation via the 3'UTR. *RNA*, 15(8):1528-42.

-
- 139 **Terenin IM, Dmitriev SE, Andreev DE, Shatsky IN.** (2008): Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2. *Nat Struct Mol Biol*, 15(8):836-41.
- 140 **Dmitriev SE, Terenin IM, Andreev DE, Ivanov PA, Dunaevsky JE, Merrick WC, Shatsky IN.** (2010): GTP-independent tRNA delivery to the ribosomal P-site by a novel eukaryotic translation factor. *J Biol Chem*, 285(35):26779-87.
- 141 **Kim JH, Park SM, Park JH, Keum SJ, Jang SK.** (2011): eIF2A mediates translation of hepatitis C viral mRNA under stress conditions. *EMBO J*, 30(12):2454-64.
- 142 **Bung C, Bochkaeva Z, Terenin I, Zinovkin R, Shatsky IN, Niepmann M.** (2010): Influence of the hepatitis C virus 3'-untranslated region on IRES-dependent and cap-dependent translation initiation. *FEBS Lett*, 584(4):837-42.
- 143 **Wang QQ, Zhang J, Hu JS, Chen HT, Du L, Wu LQ, Ding YZ, Xiong SH, Huang XC, Zhang YH, Liu YS.** (2011): Rapid detection of hepatitis C virus RNA by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 63(1):144-7.
- 144 **Kenan DJ, Query, CC, Keene JD.** (1991): RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Cell Press*, (16)214-220.
- 145 **Makeyev AV, Liebhaber SA.** (2002): The poly(C)-binding proteins: a multiplicity of functions and a search for mechanisms. *RNA*, 8(3):265-78.
- 146 **Martino L, Pennell S, Kelly G, Bui TT, Kotik-Kogan O, Smerdon SJ, Drake AF, Curry S, Conte MR.** (2012): Analysis of the interaction with the hepatitis C virus mRNA reveals an alternative mode of RNA recognition by the human La protein. *Nucleic Acids Res*, 40(3):1381-94.
- 147 **Ali N, Pruijn GJ, Kenan DJ, Keene JD, Siddiqui A.** (2000): Human La antigen is required for the hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. *J Biol Chem*, 275(36):27531-40.
- 148 **Hahm B, Kim YK, Kim JH, Kim TY, Jang SK.** (1998): Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L interacts with the 3' border of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J Virol*, 72(11):8782-8.
- 149 **Kim SJ, Kim JH, Kim YG, Lim HS, Oh JW.** (2004): Protein kinase C-related kinase 2 regulates hepatitis C virus RNA polymerase function by phosphorylation. *J Biol Chem*, 279(48):50031-41.
- 150 **Paek KY, Kim CS, Park SM, Kim JH, Jang SK.** (2008): RNA-binding protein hnRNP D modulates internal ribosome entry site-dependent translation of hepatitis C virus RNA. *J Virol*, 82(24):12082-93.
- 151 **Park HG, Yoon JY, Choi M.** (2007): Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D/AUF1 interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L. *J Biosci*, 32(7):1263-72.
-

-
- 152 **Maraia RJ, Lamichhane TN.** (2011): 3' processing of eukaryotic precursor tRNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, (2)362-375.
- 153 **Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schüttler CG, Fehr C, Jünemann C, Niepmann M.** (2008): microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J*, 27(24): 3300–3310.
- 154 **Wilson JA, Zhang C, Huys A, Richardson CD.** (2011): Human Ago2 is required for efficient microRNA 122 regulation of hepatitis C virus RNA accumulation and translation. *J Virol*, 85(5):2342-50.
- 155 **Conrad KD, Giering F, Erfurth C, Neumann A, Fehr C, Meister G, Niepmann M.** (2013): MicroRNA-122 dependent binding of Ago2 protein to hepatitis C virus RNA is associated with enhanced RNA stability and translation stimulation. *PLoS One*, 8(2):e56272.
- 156 **Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N.** (2008): Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*, 9(2):102-14.
- 157 **Bartel DP.** (2009): MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2):215-33.
- 158 **Liu J.** (2008): Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs. *Curr Opin Cell Biol*, 20(2):214-21.
- 159 **Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM.** (2003): bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila. *Cell*, 113(1):25-36.
- 160 **Neault M, Mallette FA, Richard S.** (2016): miR-137 Modulates a Tumor Suppressor Network-Inducing Senescence in Pancreatic Cancer Cells *Cell*, 14(8):1966-1987.
- 161 **Wilfred BR, Wang WX, Nelson PT.** (2007): Energizing miRNA research: a review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR-103/107 regulates human metabolic pathways. *Mol Genet Metab*, 91(3):209-17.
- 162 **Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P.** (2005): Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*, 309(5740):1577-81.
- 163 **Huang J, Wang F, Argyris E, Chen K, Liang Z, Tian H, Huang W, Squires K, Verlinghieri G, Zhang H.** (2007): Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat Med*, 13(10):1241-7.
- 164 **Barth S, Pfuhl T, Mamiani A, Ehses C, Roemer K, Kremmer E, Jäker C, Höck J, Meister G, Grässer FA.** (2008): Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5. *Nucleic Acids Res*, 36(2):666-75.
-

- 165 **Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A.** (2004): Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*, 14(10A):1902-10.
- 166 **Gregory RI, Chendrimada TP, Shiekhattar R.** (2006): MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex. *Methods Mol Biol*.
- 167 **Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R.** (2004): The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 432(7014):235-40.
- 168 **Murchison EP und Hannon GJ.** (2004): miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Curr Opin Cell Biol*, 16(3):223-9.
- 169 **Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R.** (2005): TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 436(7051):740-4.
- 170 **Kim VN, Han J, Siomi MC.** (2009): Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10:126-139.
- 171 **Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD.** (2003): Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115(2):209-16.
- 172 **Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD.** (2003): Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. *Cell*, 115(2):199-208.
- 173 **Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, Kim VN.** (2006): The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J*, 25(3):522-32.
- 174 **Meister G, Landthaler M, Peters L, Chen PY, Urlaub H, Lührmann R, Tuschl T.** (2005): Identification of novel argonaute-associated proteins. *Curr Biol*, 15(23):2149-55.
- 175 **Melo SA und Kalluri R.** (2012): Molecular pathways: microRNAs as cancer therapeutics. *Clin Cancer Res*, 18(16):4234-9.
- 176 **Wang G und Reinke V.** (2008): A C. elegans Piwi, PRG-1, regulates 21U-RNAs during spermatogenesis. *Curr Biol*, 18(12):861-7.
- 177 **Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L.** (2004): Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, 305(5689):1434-7.
- 178 **Bouasker S und Simard MJ.** (2009): The Argonaute silencing complex at work. *Nature*, 461:743-744.
- 179 **Ørom UA und Lund AH.** (2010): Experimental identification of microRNA targets. *Gene*, 451(1-2):1-5.
- 180 **Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T.** (2004): Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, 15(2):185-97.

- 181 **Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R.** (2005): MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol*, 7(7): 719–723.
- 182 **Kulkarni M, Ozgur S, Stoecklin G.** (2010): On track with P-bodies. *Biochem Soc Trans*, 38(Pt 1):242-51.
- 183 **Chang J, Nicolas E, Marks D, Sander C, Lerro A, Buendia MA, Xu C, Mason WS, Moloshok T, Bort R, Zaret KS, Taylor JM.** (2004): miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol*, 1(2):106-13.
- 184 **Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T.** (2002): Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*, 12(9):735-9.
- 185 **Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, Watts L, Booten SL, Graham M, McKay R, Subramaniam A, Propp S, Lollo BA, Freier S, Bennett CF, Bhanot S, Monia BP.** (2006): miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab*, 3(2):87-98.
- 186 **Castoldi M, Vujic Spasic M, Altamura S, Elmén J, Lindow M, Kiss J, Stolte J, Sparla R, D'Alessandro LA, Klingmüller U, Fleming RE, Longerich T, Gröne HJ, Benes V, Kauppinen S, Hentze MW, Muckenthaler MU.** (2011): The liver-specific microRNA miR-122 controls systemic iron homeostasis in mice. *J Clin Invest*, 121(4):1386-96.
- 187 **Kutay H, Bai S, Datta J, Motiwala T, Pogribny I, Frankel W, Jacob ST, Ghoshal K.** (2006): Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J Cell Biochem*, 99(3):671-8.
- 188 **Bai S, Nasser MW, Wang B, Hsu SH, Datta J, Kutay H, Yadav A, Nuovo G, Kumar P, Ghoshal K.** (2009): MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib. *J Biol Chem*, 284(46):32015-27.
- 189 **Gramantieri L, Giovannini C, Lanzi A, Chieco P, Ravaioli M, Venturi A, Grazi GL, Bolondi L.** (2007): Aberrant Notch3 and Notch4 expression in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int*, 27(7):997-1007.
- 190 **Aravalli RN, Steer CJ, Cressman EN.** (2008): Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 48(6):2047-63.
- 191 **Jopling CL, Schütz S, Sarnow, P.** (2008): Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host Microbe*, 4:77-85.
- 192 **Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH.** (2008): MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell*, 30(4):460-71.
- 193 **Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA.** (2007): Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, 318(5858):1931-4.

-
- 194 **Jangra RK, Yi M, Lemon SM.** (2010): Regulation of hepatitis C virus translation and infectious virus production by the microRNA miR-122. *J Virol*, 84(13):6615-25.
- 195 **Roberts AP, Lewis AP, Jopling CL.** (2011): miR-122 activates hepatitis C virus translation by a specialized mechanism requiring particular RNA components. *Nucleic Acids Res*, 39(17):7716-29.
- 196 **Goergen D und Niepmann M.** (2012): Stimulation of Hepatitis C Virus RNA translation by microRNA-122 occurs under different conditions in vivo and in vitro. *Virus Res*, 167(2):343-52.
- 197 **Fehr C, Conrad KD, Niepmann M.** (2012): Differential stimulation of hepatitis C virus RNA translation by microRNA-122 in different cell cycle phases. *Cell Cycle*, 11(2):277-85.
- 198 **Villanueva RA, Jangra RK, Yi M, Pyles R, Bourne N, Lemon SM.** (2010): miR-122 does not modulate the elongation phase of hepatitis C virus RNA synthesis in isolated replicase complexes. *Antiviral Res*, 88(1):119-123.
- 199 **Machlin ES, Sarnow P, Sagan SM.** (2011): Masking the 5' terminal nucleotides of the hepatitis C virus genome by an unconventional microRNA-target RNA complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108(8):3193-8.
- 200 **Shimakami T, Yamane D, Jangra RK, Kempf BJ, Spaniel C, Barton DJ, Lemon SM.** (2012a): Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109(3):941-6.
- 201 **Shimakami T, Yamane D, Welsch C, Hensley L, Jangra RK, Lemon SM.** (2012b): Base pairing between hepatitis C virus RNA and microRNA 122 3' of its seed sequence is essential for genome stabilization and production of infectious virus. *J Virol*, 86(13):7372-83.
- 202 **Li Y, Masaki T, Yamane D, McGivern DR, Lemon SM.** (2013): Competing and noncompeting activities of miR-122 and the 5' exonuclease Xrn1 in regulation of hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(5):1881-6.
- 203 **Sedano CD und Sarnow P2.** (2014): Hepatitis C virus subverts liver-specific miR-122 to protect the viral genome from exoribonuclease Xrn2. *Cell Host Microbe*, 16(2):257-64.
- 204 **Berezhna SY, Supekova L, Sever MJ, Schultz PG, Deniz AA.** (2011): Dual regulation of hepatitis C viral RNA by cellular RNAi requires partitioning of Ago2 to lipid droplets and P-bodies. *RNA*, 17(10):1831-45.
- 205 **Nasheri N, Singaravelu R, Goodmurphy M, Lyn RK, Pezacki JP.** (2011): Competing roles of microRNA-122 recognition elements in hepatitis C virus RNA. *Virology*, 410(2):336-44.
-

- 206 **Mortimer SA und Doudna JA.** (2013): Unconventional miR-122 binding stabilizes the HCV genome by forming a trimolecular RNA structure. *Nucleic Acids Res*, 41(7):4230-40.
- 207 **Blight KJ, McKeating JA, Rice CM.** (2002): Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*, 76(24):13001-14.
- 208 **Laemmli UK.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature*, 227(5259): 680-685.
- 209 **Zinn K, DiMaio D, Maniatis T.** (1983): Identification of two distinct regulatory regions adjacent to the human beta-Interferon gene. *Cell*, 34:865-879.
- 210 **Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM.** (2005): Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*, 309(5734):623-6.
- 211 **Darty K, Denise A, Ponty Y.** (2009): VARNA: Interactive drawing and editing of the RNA secondary structure. *Bioinformatics*, 25(15):1974-5.
- 212 **Koshkin AA, Singh SK, Nielsen P, Rajwanshi VK, Kumar R, Meldgaard M, Olsen CE, Wengel J.** (1998): LNA (Locked Nucleic Acid): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. *Tetrahedron*, 54: 3607-3630.
- 213 **Kaur H, Arora A, Wengel J, Maiti S.** (2006): Thermodynamic, counterion, and hydration effects for the incorporation of locked nucleic acid nucleotides into DNA duplexes. *Biochemistry*, 45(23):7347-55.
- 214 **Thibault PA, Huys A, Amador-Cañizares Y, Gailius JE, Pinel DE, Wilson JA.** (2015): Regulation of Hepatitis C Virus Genome Replication by Xrn1 and MicroRNA-122 Binding to Individual Sites in the 5' Untranslated Region. *J Virol*, 89(12):6294-311.
- 215 **Schirle NT, Sheu-Gruttadauria J, MacRae IJ.** (2014): Structural basis for microRNA targeting. *Science*, 346(6209):608-13.
- 216 **Lukavsky PJ.** (2009): Structure and function of HCV IRES domains. *Virus Res*, 139(2):166-71.
- 217 **Marín RM, Vaníček J.** (2011): Efficient use of accessibility in microRNA target prediction. *Nucleic Acids Res*, 39(1):19–29.
- 218 **Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E.** (2007): The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet*, 39(10):1278-84.
- 219 **Saetrom P, Heale BS, Snøve O Jr, Aagaard L, Alluin J, Rossi JJ.** (2007): Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity. *Nucleic Acids Res*, 35(7):2333-42.

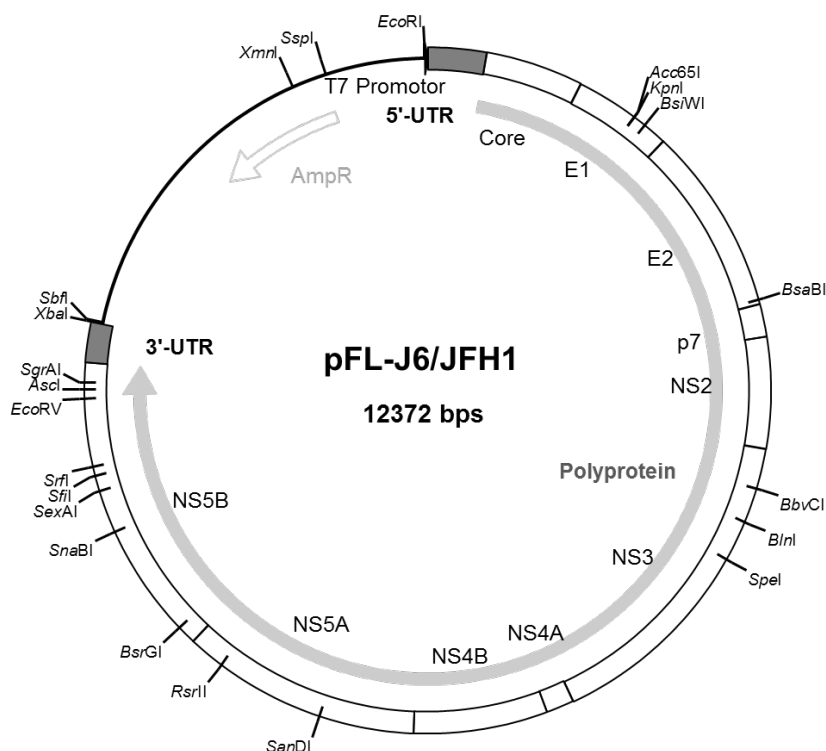
- 220 **Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM.** (2005): Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*, 3(3):e85.
- 221 **Doench JG und Sharp PA.** (2004): Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev*, 18(5):504-11.
- 222 **Broderick JA, Salomon WE, Ryder SP, Aronin N, Zamore PD.** (2011): Argonaute protein identity and pairing geometry determine cooperativity in mammalian RNA silencing. *RNA*, 17(10):1858-69.
- 223 **Filbin ME, Kieft JS.** (2011): HCV IRES domain IIb affects the configuration of coding RNA in the 40S subunit's decoding groove. *RNA*, 17(7):1258-73.
- 224 **Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ.** (2007): The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(2):113-26.
- 225 **Song MG, Li Y, Kiledjian M.** (2010): Multiple mRNA decapping enzymes in mammalian cells. *Mol Cell*, 40(3):423-32.
- 226 **Jones CI, Zabolotskaya MV, Newbury SF.** (2012): The 5' → 3' exoribonuclease XRN1/Pacman and its functions in cellular processes and development. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 3(4):455-68.
- 227 **Liu Q, Greimann JC, Lima CD.** (2006): Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell*, 127(6):1223-37.
- 228 **Jinek M, Coyle SM, Doudna JA.** (2011): Coupled 5' nucleotide recognition and processivity in Xrn1-mediated mRNA decay. *Mol Cell*, 41(5):600-8.
- 229 **Schlee M, Roth A, Hornung V, Hagmann CA, Wimmenauer V, Barchet W, Coch C, Janke M, Mihailovic A, Wardle G, Juranek S, Kato H, Kawai T, Poeck H, Fitzgerald KA, Takeuchi O, Akira S, Tuschl T, Latz E, Ludwig J, Hartmann G.** (2009): Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity*, 31(1):25-34.
- 230 **Marques JT, Devosse T, Wang D, Zamanian-Daryoush M, Serbinowski O, Hartmann R, Fujita T, Behlke MA, Williams BRG.** (2006): A structural basis for discriminating between self and nonself double-stranded RNAs in mammalian cells. *Nat Biotech*, 24:559-565.
- 231 **Bigger CB, Guerra B, Brasky KM, Hubbard G, Beard MR, Luxon BA, Lemon SM, Lanford RE.** (2004): Intrahepatic gene expression during chronic hepatitis C virus infection in chimpanzees. *J Virol*, 78(24):13779-92.
- 232 **Moon SL, Blackinton JG, Anderson JR, Dozier MK, Dodd BJ, Keene JD, Wilusz CJ, Bradrick SS, Wilusz J.** (2015): XRN1 stalling in the 5' UTR of Hepatitis C virus and Bovine Viral Diarrhea virus is associated with dysregulated host mRNA stability. *PLoS Pathog*, 11(3):e1004708.

- 233 **Angus AG, Dalrymple D, Boulant S, McGivern DR, Clayton RF, Scott MJ, Adair R, Graham S, Owsianka AM, Targett-Adams P, Li K, Wakita T, McLauchlan J, Lemon SM, Patel AH.** (2010): Requirement of cellular DDX3 for hepatitis C virus replication is unrelated to its interaction with the viral core protein. *J Gen Virol*, 91(Pt 1):122-32.
- 234 **Scheller N, Mina LB, Galão RP, Chari A, Giménez-Barcons M, Noueiry A, Fischer U, Meyerhans A, Díez J.** (2009): Translation and replication of hepatitis C virus genomic RNA depends on ancient cellular proteins that control mRNA fates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(32):13517-22.
- 235 **Ariumi Y, Kuroki M, Kushima Y, Osugi K, Hijikata M, Maki M, Ikeda M, Kato N.** (2011): Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets. *J Virol*, 85(14):6882-92.
- 236 **Balagopal V, Parker R.** (2009): Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. *Curr Opin Cell Biol*, 21(3):403-8.
- 237 **Srisawat C und Engelke DR.** (2002): RNA affinity tags for purification of RNAs and ribonucleoprotein complexes. *Methods*, 26(2):156-61.
- 238 **Kuo MY, Sharmeen L, Dinter-Gottlieb G, Taylor J.** (1988): Characterization of self-cleaving RNA sequences on the genome and antigenome of human hepatitis delta virus. *J Virol*, 62(12):4439-44.

6 Anhang

6.1 Plasmidkarten

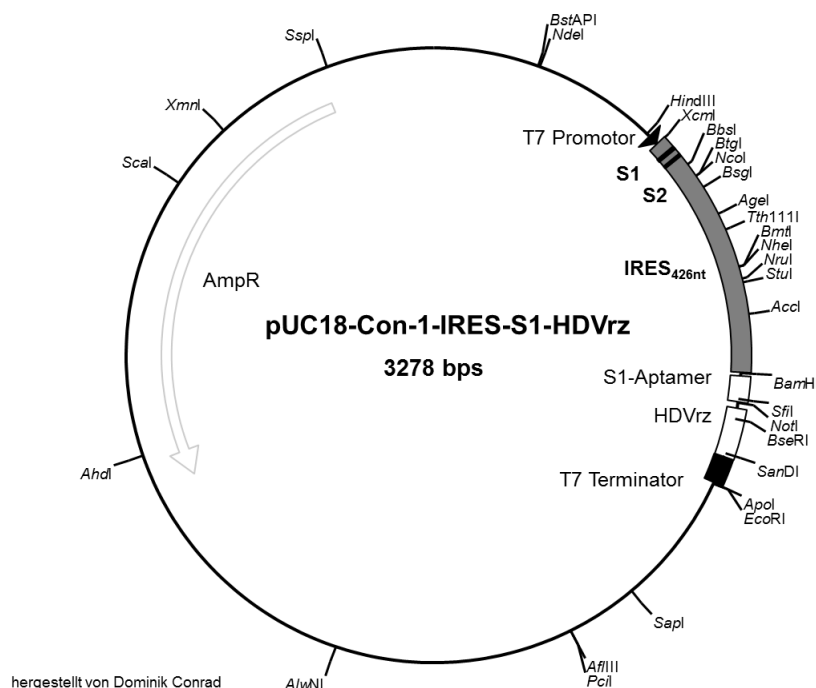
6.1.1 pFL-J6/JFH1



Region	Beschreibung	Start [nt]	Ende [nt]
5'-UTR	Sequenz der HCV 5'-untranslatierten Region	1	340
Polyprotein	Sequenz für das Polyprotein, kodierend für die viralen Proteine: Core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A/B, NS5A/B	341	9442
3'-UTR	Sequenz der HCV 3'-untranslatierten Region	9443	9677
AmpR	Ampicillin-Resistenzgen	11714	10881
T7-Promotor	Promotor für die T7-RNA-Polymerase	12355	12372

Plasmid zur Isolation der HCV-IRES-Sequenz von J6/JFH1 (Rice Laboratorien, Rockefeller Universität, NY, USA) für weitere Konstrukte zur Untersuchung der miR-122-Bindungsstellen. Dafür wurden 432 nt der IRES über PCR amplifiziert, wobei das Primerpaar die für die Klonierung entsprechenden Schnittstellen enthielten. Die Plasmid-DNA enthält die komplette Sequenz von J6/JFH-1 (Subtyp 2a) einschließlich 5'-UTR, kodierender Sequenz für das Polyprotein und 3'-UTR. Über einen T7-Promotor kann dieser Teil *in vitro*-transkribiert werden. Die Karte zeigt außerdem einige Erkennungssequenzen einfacher Restriktionsschnittstellen im Plasmid.

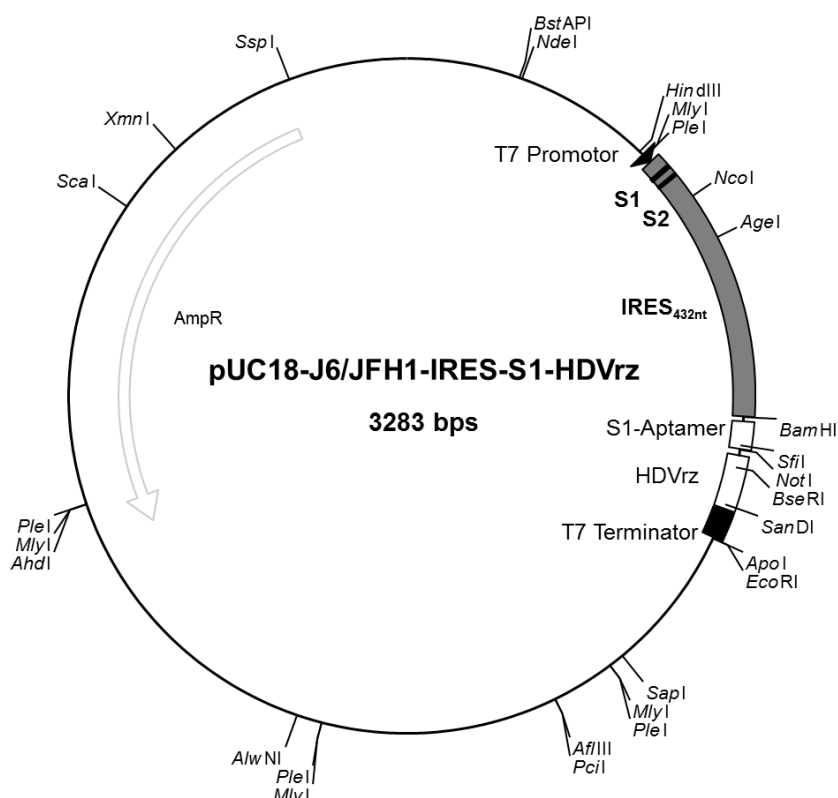
6.1.2 pUC18-Con-1-IRES-S1-HDVrz



Region	Beschreibung	Start [nt]	Ende [nt]
T7- Promotor	Promotor für die T7-RNA-Polymerase	406	422
IRES _{426nt}	426 nt der HCV Con-1-IRES-Sequenz	423	848
S1	Erste miR-122-Bindungsstelle in der 5'-UTR	444	450
S2	Zweite miR-122-Bindungsstelle in der 5'-UTR	460	465
S1-Aptamer	Sequenz für das ursprüngliche S1-Aptamer	855	899
HDVrz	Sequenz für das Hepatitis Delta Virus-Ribozym	909	995
T7-Terminator	Terminator für die T7-RNA-Polymerase	996	1024
AmpR	Ampicillin-Resistenzgen	3078	2218

Plasmid zum Austausch der HCV-IRES-Sequenz von Con-1 mit der von J6/JFH1 (pFL-J6/JFH1) zur Untersuchung der miR-122-Bindungsstellen. Das Plasmid trägt den zur *in vitro*-Transkription benötigten T7-Promotor gefolgt von 426 nt der HCV-Con-1-IRES. Dahinter befindet sich eine S1-Aptamer-Sequenz, ein kleines strukturiertes und Streptavidin-bindendes RNA-Motiv zur Isolation von nativen *in vivo*-RNA-Protein-Komplexen ^[237]. Zur Möglichkeit der Transfektion des Plasmids in T7-Polymerase exprimierende eukaryotische Zellen wurde eine Hepatitis Delta Virus-Ribozym- (HDVrz-) Sequenz eingefügt. Diese nicht-kodierende RNA prozessiert RNA-Transkripte durch Restriktion direkt vor ihrer eigenen Sequenz ohne die Beteiligung weiterer viraler oder zellulärer Faktoren ^[238]. Am Ende befindet sich zusätzlich eine T7-Terminator-Sequenz. Die Karte zeigt außerdem einige Erkennungssequenzen einfacher Restriktionsschnittstellen im Plasmid.

6.1.3 pUC18-J6/JFH1-IRES-S1-HDVrz

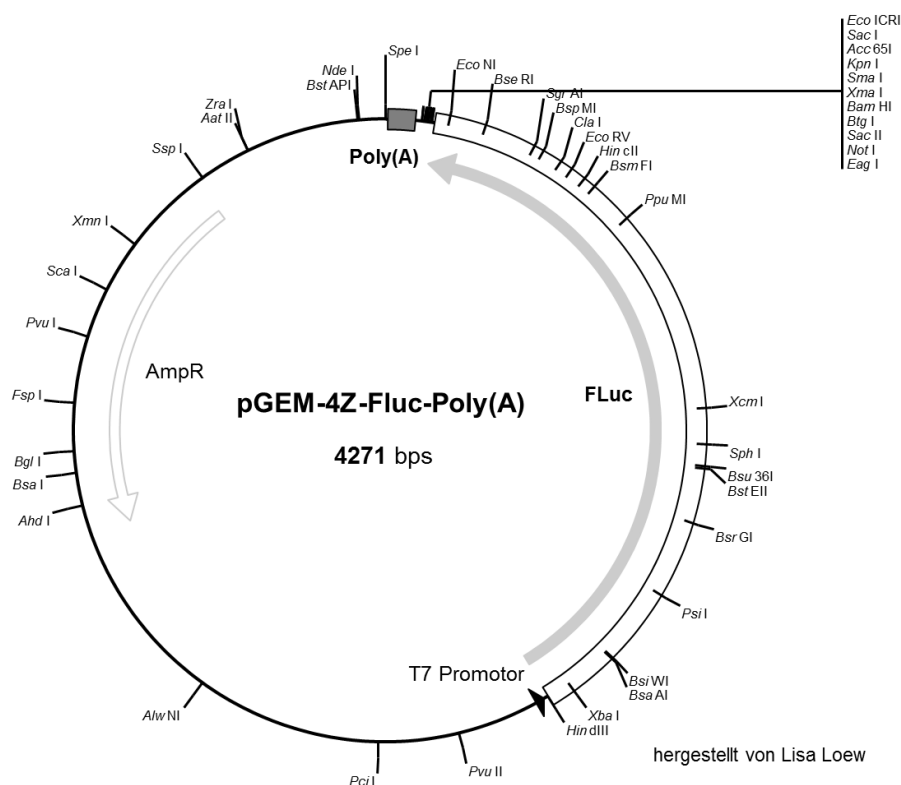


Region	Beschreibung	Start [nt]	Ende [nt]
T7-Promotor	Promotor für die T7 RNA Polymerase	405	421
IRES _{432nt}	432 nt der HCV J6/JFH1 IRES Sequenz	422	853
S1	Erste miR-122 Bindungsstelle in der 5'-UTR	442	448
S2	Zweite miR-122 Bindungsstelle in der 5'-UTR	458	463
S1-Aptamer	Sequenz für das ursprüngliche S1-Aptamer	860	904
HDVrz	Sequenz für das Hepatitis Delta Virus Ribozym	914	1000
T7-Terminator	Terminator für die T7 RNA Polymerase	1001	1047
AmpR	Ampicillin-Resistenzgen	3083	2223

Plasmid zur Herstellung von HCV-5'-UTR-RNA zur Untersuchung der miR-122-Bindungsstellen. Die DNA-Matrize für die *in vitro*-Transkription wird über PCR generiert um ein exaktes Ende der IRES für die co-IP zu erhalten (363 nt).

Das Plasmid enthält das Grundgerüst von pUC18-Con-1-IRES-S1-HDVrz und enthält ebenso den T7-Promotor und -Terminator, die S1-Aptamer-Sequenz zur Isolation der HCV-RNA aus Zelllysate und eine HDV-Ribozym- (HDVrz-) Sequenz zur Generierung eines exakten Sequenzendes. Die Länge der IRES Sequenz von J6/JFH-1 beträgt hierbei 432 nt und wurde über Primer mit Schnittstellen für *HindIII* und *BamHI* in der PCR amplifiziert und anschließend in den präparierten Vektor ligiert. Die Karte zeigt außerdem einige Erkennungssequenzen einfacher Restriktionsschnittstellen im Plasmid.

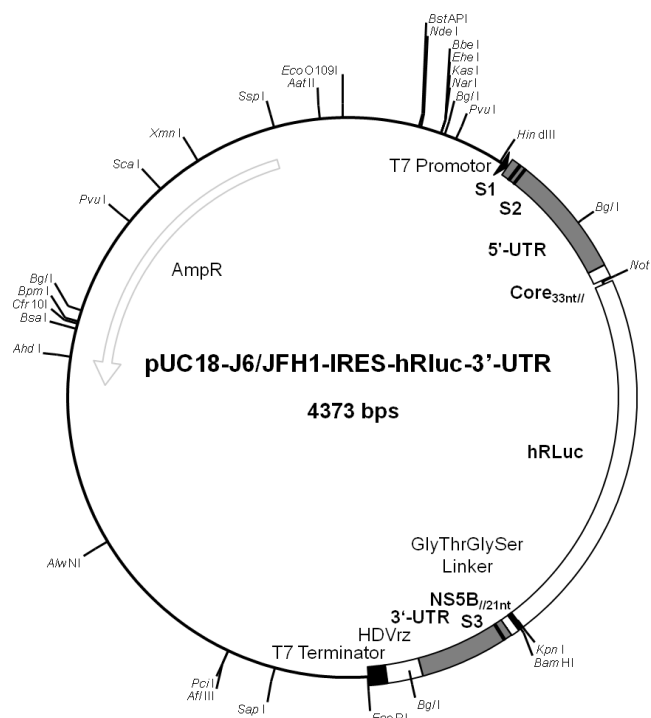
6.1.4 pGEM-4Z-FLuc-Poly(A)



Region	Beschreibung	Start [nt]	Ende [nt]
poly(A)	Sequenz für den poly(A)-Bereich von 62 nt	67	6
FLuc	Kodierende Sequenz für die <i>Firefly Luciferase</i>	1761	109
T7-Promotor	Promotor für die T7-RNA-Polymerase	1791	1772
AmpR	Ampicillin-Resistenzgen	3831	2971

Plasmid zur Expression des Reporterproteins *Firefly-Luciferase* (FLuc) als interne Transfektionskontrolle. Durch Restriktionsverdau mit SpeI hinter der poly(A)-Sequenz kann ein für die *in vitro*-Transkription definiertes Ende generiert werden. Die Plasmid-DNA enthält einen T7-Promotor und die komplette kodierende Sequenz von FLuc, einschließlich poly(A)-Bereich. Die Karte zeigt außerdem einige Erkennungssequenzen einfacher Restriktionsschnittstellen im Plasmid.

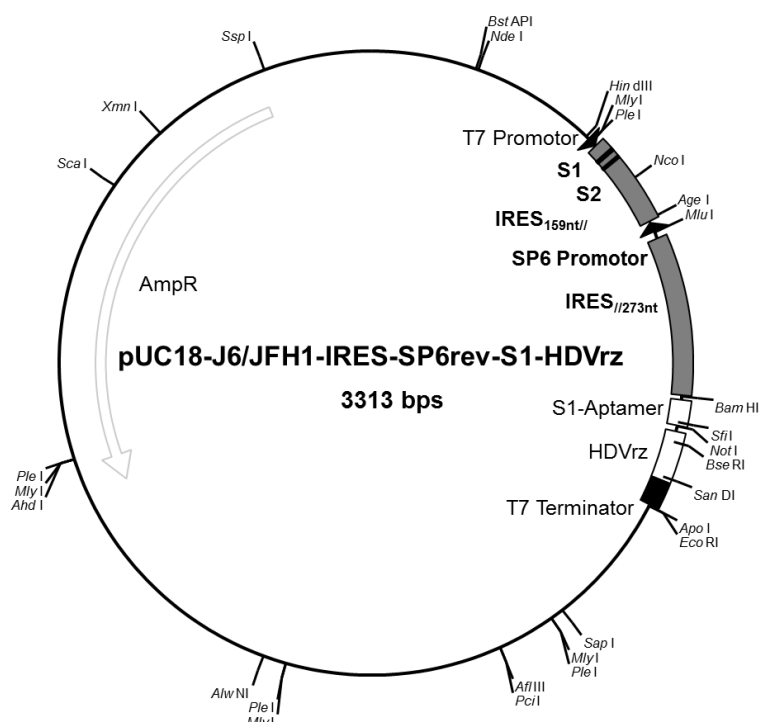
6.1.5 pUC18-J6/JFH1-IRES-hRLuc-3'-UTR



Region	Beschreibung	Start [nt]	Ende [nt]
T7-Promotor	Promotor für die T7-RNA-Polymerase	405	421
5'-UTR	Sequenz der HCV-5'-untranslatierten Region	422	761
S1	Erste miR-122-Bindungsstelle in der 5'-UTR	442	448
S2	Zweite miR-122-Bindungsstelle in der 5'-UTR	458	463
Core _{33nt}	33 nt der Core-kodierenden Sequenz	762	794
hRLuc	Kodierende Sequenz für die humanisierte Renilla Luciferase	804	1733
GlyThrGlySer Linker	Linker-Region aus den kodierenden Basen für Glycin (Gly), Threonin (Thr) und Serin (Ser)	1734	1745
NS5B _{21nt}	21 nt der NS5B-kodierenden 3'-Sequenz	1746	1766
3'-UTR	Sequenz der HCV-3'-untranslatierten Region	1767	2002
S3	Dritte miR-122-Bindungsstelle in der 3'-UTR	1784	1790
HDVr _z	Sequenz für das Hepatitis Delta Virus-Ribozym	2003	2089
T7-Terminator	Terminator für die T7-RNA-Polymerase	2090	2136
Amp ^R	Ampicillin -Resistenzgen	4173	3313

Plasmid zur Herstellung der HCV-Reporter-RNA mit HCV-IRES und 3'-UTR. Die Produktion der DNA-Matrize für die Transkription erfolgt über PCR, um ein exaktes 3'-Ende zu generieren. Die wichtigsten Elemente sind der T7-Promotor, die HCV-5'-UTR, ein Teil der Core-kodierenden Sequenz, die kodierende Sequenz für die humanisierte *Renilla-Luciferase* (hRLuc), gefolgt von einer Linker-Region sowie einem Teil der NS5B-kodierenden Sequenz mit abschließender 3'-UTR. Dieses Plasmid wurde nach meinen Vorgaben von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert. Die Karte zeigt außerdem einige Erkennungssequenzen einfacher Restriktionsschnittstellen im Plasmid.

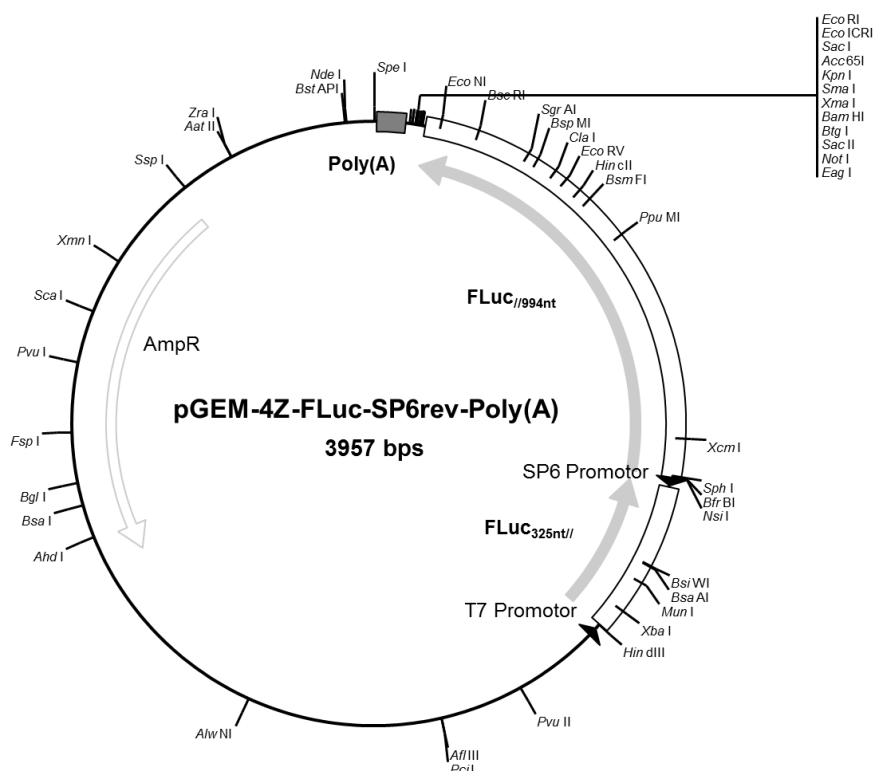
6.1.6 pUC18-J6/JFH1-IRES-SP6rev-S1-HDVrz



Region	Beschreibung	Start [nt]	Ende [nt]
T7-Promotor	Promotor für die T7-RNA-Polymerase	405	421
IRES _{159nt//}	159 nt der 5'-gelegenen HCV-J6/JFH1-IRES-Sequenz	422	580
S1	Erste miR-122-Bindungsstelle in der 5'-UTR	442	448
S2	Zweite miR-122-Bindungsstelle in der 5'-UTR	458	463
SP6-Promotor	Promotor für die SP6-RNA-Polymerase	598	581
IRES _{//273nt}	273 nt der 3'-gelegenen HCV-J6/JFH1-IRES-Sequenz	611	883
S1-Aptamer	Sequenz für das ursprüngliche S1-Aptamer	890	934
HDVrz	Sequenz für das Hepatitis Delta Virus-Ribozym	944	1030
T7-Terminator	Terminator für die T7-RNA-Polymerase	1031	1077
AmpR	Ampicillin-Resistenzgen	3113	2253

Plasmid zur Herstellung der HCV-5'-UTR-antisense-RNA für den *RNase Protection Assay*. Die Produktion der DNA-Matrize für die Transkription erfolgt über PCR. Das Plasmid enthält das Grundgerüst von pUC18-J6/JFH1-IRES-S1-HDVrz und enthält ebenso den T7-Promotor und -Terminator, die S1-Aptamer-Sequenz und eine HDV-Ribozym- (HDVrz-) Sequenz. Zusätzlich wurde ein SP6-Promoter in die gegenläufige Richtung über hybridisierte Oligo-Sequenzen mit *AgeI*-Schnittstellen in die IRES-Sequenz eingesetzt. Dieser dient der *in vitro*-Transkription der komplementären HCV-RNA. Die Karte zeigt außerdem einige Erkennungssequenzen einfacher Restriktionsschnittstellen im Plasmid.

6.1.7 pGEM-4Z-FLuc-SP6rev-Poly(A)



Region	Beschreibung	Start [nt]	Ende [nt]
poly(A)	Sequenz für den poly(A)-Bereich von 62 nt	67	6
FLuc _{994nt}	994 nt der 3'-gelagerten kodierenden Sequenz für die <i>Firefly Luciferase</i>	1102	109
SP6-Promotor	Promotor für die SP6 RNA Polymerase	1103	1120
FLuc _{325nt}	325 nt der 5'-gelagerten kodierenden Sequenz für die <i>Firefly Luciferase</i>	1447	1123
T7-Promotor	Promotor für die T7-RNA-Polymerase	1477	1458
AmpR	Ampicillin-Resistenzgen	3517	2657

Plasmid zur Herstellung der *Firefly-Luciferase*- (FLuc-) antisense-RNA für den *RNase Protection Assay* als interne Kontrolle. Die Produktion der DNA-Matrize für die Transkription erfolgt über PCR. Das Plasmid enthält das Grundgerüst von pGEM-4Z-FLuc-Poly(A) und enthält ebenso den T7-Promotor, die FLuc-kodierende Sequenz sowie den poly(A)-Bereich. Zusätzlich wurde ein SP6-Promoter in die gegenläufige Richtung über hybridisierte Oligo-Sequenzen mit entsprechenden Schnittstellen in die kodierende Sequenz eingesetzt. Dieser dient der *in vitro*-Transkription der komplementären FLuc-RNA. Die Karte zeigt außerdem einige Erkennungssequenzen einfacher Restriktionsschnittstellen im Plasmid.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Struktur eines HCV-Partikels.	3
Abbildung 1.2: Genomische Organisation von HCV.	3
Abbildung 1.3: Struktur der HCV-5'- und -3'-UTR sowie der CRE-Region.....	4
Abbildung 1.4: Polyprotein-Prozessierung von HCV.....	6
Abbildung 1.5: Infektionszyklus von HCV..	8
Abbildung 1.6: Modell des Zusammenbaus eines HCV-Partikels.....	10
Abbildung 1.7: Die vier Typen klassischer IRES-Strukturen.....	12
Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der Cap-abhängigen Translationsinitiation.	13
Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der IRES-abhängigen Translationsinitiation von HCV.	15
Abbildung 1.10: Schematische Darstellung der HCV-IRES <i>trans-acting factors</i> (ITAFs)....	16
Abbildung 1.11: Biogenese und Funktion zellulärer microRNAs.	18
Abbildung 1.12: Schematischer Aufbau und Kristallstruktur des <i>RNA-induced silencing</i> <i>complex</i>	19
Abbildung 1.13: Darstellung der miR-122-Bindungsstellen im HCV-Genom.	21
Abbildung 1.14: Bindung der miR-122 an die HCV-5'-UTR.	22
Abbildung 2.1: Aufteilung der Neubauer Zählkammer.....	55
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Ablaufs eines <i>RNase Protection Assays</i>	64
Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Wildtyp- und mutierten HCV-5'-UTRs und die Bindung der miR-122.	68
Abbildung 3.2: Faltung von Wildtyp- und mutierter HCV-5'-UTR.	70
Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Faltung von Wildtyp- und mutierter HCV-5'- UTR.....	71
Abbildung 3.4: Anti-Ago2-RNA-co-IP mit Wildtyp- (S1S2) und mutierter (S1mS2m) HCV- IRES.....	74
Abbildung 3.5: Anti-Ago2-RNA-co-IP mit mutierter HCV-5'-UTR (S1mS2m) zur Kontrolle der Spezifität der kompensierenden miRNAs.	76
Abbildung 3.6: Effizienz der Bindung der mutierten miRNAs an S1m und S2m in der HCV- 5'-UTR.	78
Abbildung 3.7: <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> der modifizierten Wildtyp-HCV-5'-UTR mit miR-122.....	81
Abbildung 3.8: <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> der mutierten HCV-5'-UTR unter Zugabe verschiedener Nukleinsäuren (NA).	82
Abbildung 3.9: Schematische Darstellung der HCV-Reporter-Konstrukte.	84

Abbildung 3.10: Luciferase-Assay mit Wildtyp-HCV-Reporter-Konstrukt.....	86
Abbildung 3.11: Luciferase-Assay mit mutiertem HCV-Reporter-Konstrukt.....	87
Abbildung 3.12: Schematische Darstellung der im <i>RNase Protection Assay</i> (RPA) verwendeten Sonden von HCV und FLuc.....	89
Abbildung 3.13: Titration der anti-S1S2-Sonde mit re-extrahierter, modifizierter Wildtyp- (wt _{mod} -) HCV-Reporter-RNA.	91
Abbildung 3.14: <i>RNase Protection Assay</i> (RPA).....	93
Abbildung 3.15: Analyse der Proben aus dem <i>RNase Protection Assay</i> (RPA) auf einem Sequenziergel.	95
Abbildung 3.16: Schematische Darstellung der einzeln mutierten HCV-5'-UTRs mit den ihren kompensierenden miRNAs.	97
Abbildung 3.17: Anti-Ago2-RNA-co-IP mit einzeln mutierter (S1S2m, S1mS2) HCV-5'-UTR.	99
Abbildung 3.18: Modell der Faltung von separat mutierter HCV-5'-UTR.....	100
Abbildung 3.19: Effizienz der Bindung der miRNA an ihre Erkennungssequenzen in der einzeln mutierten HCV-5'-UTR.....	102
Abbildung 3.20: Schematische Darstellung der HCV-Reporter-Konstrukte mit Einzelmutanten.....	104
Abbildung 3.21: Luciferase-Assay mit modifiziertem Wildtyp- und mutierten HCV-Reporter- Konstrukten.	105
Abbildung 3.22: Schematische Darstellung der Überkreuz-agierenden miRNAs in der HCV- 5'-UTR.	108
Abbildung 3.23: Anti-Ago2-RNA-co-IP mit doppelt-mutierter (S1mS2m) HCV-5'-UTR.....	109
Abbildung 3.24: <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> der mutierten HCV-5'-UTR mit <i>Cross- over</i> -miRNAs.....	110

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Standardreaktionsansatz für die PCR.	40
Tabelle 2.2: Standard PCR-Programm.	40
Tabelle 2.3: Standardreaktionsansatz für die Mutagenese.	41
Tabelle 2.4: Modifiziertes <i>in vitro</i> -Mutagenese-PCR-Programm für schwierige Mutationen.	42
Tabelle 2.5: Zusammensetzung einer Standard <i>in vitro</i> -Transkriptionsreaktion.	47
Tabelle 2.6: Zusammensetzung einer <i>in vitro</i> -Transkriptionsreaktion für radioaktiv markierte RNA.	48
Tabelle 2.7: Menge der Antikörper für die anti-Ago-HCV-RNA co-IPs.....	59
Tabelle 2.8: Zusammensetzung des SDS-PAGE Trenn- und Sammelgels.	60
Tabelle 2.9: Western Blot Antikörper und ihre Verdünnungen.....	61

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Publikationen

In Revision

Dünnes, N., Gerresheim, G. K., **Nieder-Röhrmann, A.**, Fricke M., Hofacker, I., Marz, M., Niepmann, M. (2016): microRNA binding to structured RNAs correlates with target site accessibility.

Eingereicht

Nieder-Röhrmann, A., Dünnes, N., Gerresheim, G. K., Shalamova, L., Niepmann, M. (2016): Cooperative stimulation of Hepatitis C Virus RNA translation by microRNA122/Argonaute2 complexes.

Manuskript

Shalamova, L., Rossbach, O., Dünnes, N., **Nieder-Röhrmann, A.**, Gerresheim, G. K., Mueller, S., Song, Y., Wimmer, E., Niepmann, M. (2016): Dissecting the requirements for Hepatitis C virus RNA synthesis using a split replication system.

Kongressbeiträge

Nieder-Röhrmann, A., Dünnes, N., Gerresheim, G. K., Shalamova, L., Niepmann, M.: Cooperative stimulation of Hepatitis C Virus RNA translation by microRNA122/Argonaute2 complexes. Poster, 23rd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses; präsentiert von M. Niepmann, Kyoto (Japan); Oktober 2016.

Danksagung

Zunächst einmal möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich während meiner Dissertation unterstützt und mir bei der Anfertigung meiner Arbeit geholfen haben.

Ich bedanke mich vor allem bei Prof. Michael Niepmann für die Arbeit an einem so spannenden Thema, der Bereitstellung der Arbeitsmittel und des Arbeitsplatzes im Labor. Darüber hinaus bedanke ich mich für die angeregten Diskussionen und die zahlreichen Beiträge zur Problemlösung.

Speziellen Dank geht an Prof. Albrecht Bindereif, der sich bereit erklärt hat die Position als Erstprüfer meiner externen Dissertation im Fachbereich Biologie der Justus-Liebig-Universität Giessen zu übernehmen.

Zudem möchte ich mich bei der IRTG bedanken, die zahlreiche Kosten für Reisen, Workshops und Fortbildungen übernommen hat und mir so die Chance gab mich in vielerlei Hinsicht beruflich und persönlich weiterzuentwickeln. Im gleichen Zug möchte ich mich bei den anderen PhD-Studenten bedanken, die offen für Diskussionen und immer für Spaß zu haben waren.

Lieben Dank geht besonders an meine Freunde Nadia, Carmen und Gesche. Ohne euch hätte mein Laboralltag ziemlich grau ausgesehen. Ihr habt immer ein offenes Ohr gehabt und mich immer wieder aufgemuntert (auch wenn euch das nicht so bewusst sein sollte). Tschakka und so. ☺ Ich danke euch!!! Ebenso möchte ich Miriam danken, die, auch wenn sie öfters vergessen wurde, ihren Teil zur Aufmunterung beigetragen hat.

Ganz besonderen Dank gebührt meiner größeren zweiten Hälfte! :P

Ohne dich wäre ich vermutlich nie in Giessen gelandet und hätte damit nicht diese tollen Menschen kennengelernt (und du vermutlich auch nicht ☺) Auch wenn die Zeit nicht immer einfach war, so warst du dennoch immer für mich da, hast meine Marotten ertragen und warst an meiner Seite. Du hast mir die Kraft gegeben das alles durchzuziehen. Ich liebe dich!

Zum Schluss möchte ich mich noch bei Theo, Constanze, Berta, Hilde und z.T. bei Rüdiger bedanken, die nicht nur mir, sondern uns allen im Labor ständig zur Seite standen und durch ihr Durchhaltevermögen ihren Beitrag geleistet haben. ☺

Eidesstaatliche Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Giessen, August 2016

Anika Nieder-Röhrmann